

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**ACTIVACIÓN CONSTITUTIVA DE LA VÍA DE
SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG EN LINFOMAS
LINFOBLÁSTICOS T POR LA SOBRE-EXPRESIÓN DEL GEN
SMOOTHENED**

TESIS DOCTORAL

ELENA GONZÁLEZ GUGEL

2011

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO), en el departamento de Inmunología y Biología Celular, bajo la dirección del Prof. José Fernández Piqueras y la Dra. María C. Villa Morales.

La realización de esta tesis ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

❖ “Análisis funcionales de genes de susceptibilidad en modelos murinos de linfomas linfoblásticos T”.

SAF2009-11426. Ministerio de Educación y Ciencia. Responsable: Dr. José Fernández Piqueras.

A mis padres, **Luis y Yeyi** y a mis hermanos, **Iñaki, Chete, Javi y Jaime**

“Entregarse sin descanso a un proyecto, con paciente esfuerzo, rigurosa responsabilidad e indudable precisión y método, no puede dejar de producir la recompensa del trabajo bien hecho. Si, además, se aprecia la huella de un investigador entusiasta con fuerza de voluntad ilimitada y una mente afanosa de conocimiento, el impulso a la lectura se duplica y el resultado es una fuente de satisfacción. He aquí un ejemplo“.

Natacha Andrada

INDICE

ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN.....	13
SUMMARY.....	17
INTRODUCCIÓN	
1. El cáncer.....	18
2. Genes mayores y menores de susceptibilidad.....	19
3. Linfomas tipo T.....	20
4. Modelos animales.....	22
5. La vía GLI/ HEDGEHOG.....	25
5.1. Elementos de la vía de GLI/Hedgehog.....	25
5.2. Tipos de activación de la vía GLI/Hedgehog.....	27
5.3.La vía GLI/Hh en el Timo.....	28
5.4. Implicaciones de la vía Gli/Hh en cáncer.....	29
6. <i>SMOOTHENED</i> , el único elemento no redundante de la vía GLI/HH.....	30
7. La via GLI/HH en linfomas linfoblásticos Tde ratón inducidos por radiación gamma.....	32
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Inducción de linfomas T murinos.....	36
2. Muestras de pacientes.....	37
3. Líneas celulares.....	38
4. Extracción de ácidos nucleicos y proteínas.....	39
5. Secuenciación del gen <i>Smoothened</i>	40

6. Clonaje del ADNc de <i>Smo</i> de ratón y <i>SMO</i> humano.....	44
7. Mutagénesis dirigida.....	45
8. Tratamientos de cultivos celulares.....	46
9. Transfecciones transitorias.....	47
10. Western-Blots.....	48
11. Ensayo Luciferasa.....	49
12. Ensayos de viabilidad con 7AAD.....	49
13. Ensayos de proliferación con CFSE.....	49
14. Ensayos TUNEL.....	50
15. Estudio del Ciclo Celular.....	50
16. Inmunofluorescencia.....	50
17. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	51
18. Análisis de expresión y cuantificación de miRNAs.....	53
19. Metodos estadísticos.....	54
20. Bases de datos.....	54

RESULTADOS

1. Sobre-expresión del gen <i>Smo</i> en Linfomas linfoblásticos T en ratón.....	56
2. Análisis de sobre-expresión del gen <i>SMO</i> en muestras de Linfomas Linfoblásticos T en humano (T-LBL).....	57
3. Análisis de la expresión del gen <i>SMO</i> en líneas celulares derivadas de Linfomas Linfoblásticos T humanos y en líneas celulares derivadas de Linfomas T periféricos humanos.....	58

4. El gen <i>Smoothened</i> no experimenta mutaciones activantes en los linfomas linfoblásticos T.....	60
5. La sobre-expresión del gen <i>Smoothened</i> supone la activación de la vía GLI/HH en líneas tumorales derivadas de Linfomas/leucemias Linfoblásticos T humanos.....	61
6. La inactivación de <i>SMO</i> reduce la supervivencia celular e induce una reducción significativa de los niveles de muerte celular en líneas tumorales derivadas de Linfomas Linfoblásticas T humanos.....	64
7. Regulación de la expresión de <i>Smoothened</i> mediante miRNAs.....	71
7.1.- Análisis en linfomas linfoblasticos T de ratón.....	71
7.2.- Análisis con muestras humanas.....	76
DISCUSIÓN.....	82
CONCLUSIONES.....	90
BIBLIOGRAFÍA.....	92
AGRADECIMIENTOS.....	97
ANEXO.....	100

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc : Ácido Desoxirribonucleico codificante.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BCCs: Basal Cell Carcinomas (Carcinomas de células basales)

Bid: *BH3 Interacting Domain death agonist*, Dominio agonista de muerte que interacciona con BH3.

BSA: Bovine Serum Albumin (albúmina de suero bovino)

CBM: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

CD3: *Cluster of Differentiation 3*, Conglomerado de diferenciación 3.

CD4: Cluster of Differentiation 4 (conglomerado de diferenciación 4)

CD8: Cluster of Differentiation 8 (conglomerado de diferenciación 8)

CGH: Comparative Genomic Hybridization (hibridación genómica comparada)

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

DN: Timocitos dobles negativos (CD4-CD8-).

DP: Timocitos dobles positivos (CD4+CD8+).

FBS: *Fetal Bovine Serum*, Suero fetal bovino.

HEPES: 4-(2-Hidroxiethyl)-1-Piperazinethanosulfonic Acid.

IL-2: *Interleukina 2*.

IP: Ioduro de Propidio.

kDa: kiloDalton.

L-Gln: L-Glutamina

LB : medio de cultivo Luria Bertani

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica

LLT: Linfoma Linfoblástico T

LMA: Leucemia Mielogénica Aguda

LMC: Leucemia Mielogénica Crónica

LMMC: enfermedades mieloproliferativas crónicas

LNLA: Leucemias no Linfoblásticas Aguda

LOH: *Loss of Heterozygosity*, Pérdida de heterocigosidad. mediante la enzima Terminal deoxynucleotidyl Transferase).

mg: miligramos

MHC: *Major Histocompatibility Complex*, Complejo principal de histocompatibilidad.

miRISC: miRNA induced silencing complex

miRNAs: microRNAs

mM: miliMolar

NIH-3T3: Línea celular derivada de fibroblastos embrionarios de ratón

NK: *Natural Killer*.

NHL: Non-Hodgkin Lymphomas (Linfomas no Hodgkin)

nt: nucleótidos

Pb : pares de bases

PBS: *Phosphate Buffer Saline*, Tampón salino fosfato.

PTCL: Peripheral T-cell lymphomas (Linfomas T periféricos)

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa.

PMSF: *Phenylmethylsulphonylfluoride*. Inhibidor de Serín-proteasas, Cisteín-proteasas y Acetilcolinesterasas.

Pol: polymerase (enzima polimerasa)

qrrtRT-PCR: *Quantitative Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, cuantitativa a tiempo real.

RLU: *Relative Luminiscence Units*, Unidades relatives de luminiscencia.

RNAsa: Ribonucleasa.

Rpm: revoluciones por minuto

RPML: *Roswell Park Memorial Institute*.

RT-PCR: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

SDS-PAGE: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS.

T-ALL: T cell-Acute Lymphoblastic Lymphoma (Leucemias linfoblásticas agudas T)

T-LBL: T cell-Lymphoblastic Lymphoma (Linfomas linfoblásticos T)

TCR: *T Cell Receptor*, Receptor de Célula T.

TdT: Enzima deoxi-nucleotidil-terminal-transferasa

T.H: Línea humana de timocitos inmortalizados con el virus saimirí

TUNEL: TdT-mediated dUTP nick end labeling (marcaje con dUTP de los extremos dañados)

UAM: Universidad Autónoma de Madrid

UCM: Universidad Complutense de Madrid

UTR: untranslated region (región no codificante)

WT: Wild Type (fenotipo silvestre)

La vía GLI/Hedgehog ha recibido especial atención, no sólo por su implicación como regulador del desarrollo embrionario sino también por la contribución de sus alteraciones en el desarrollo y evolución de diferentes tipos de cánceres. La activación de la vía se ha relacionado con la generación de diversos tipos de cánceres sólidos e incluso de células B, pero no con el desarrollo de Linfomas T. La vía GLI/Hedgehog se ha visto principalmente alterada debido a mutaciones inactivantes en *PTCH*, y sólo en un 10% de los Carcinomas de células basales se han descrito mutaciones activantes de *SMO* (el único elemento no redundante de la vía). En esta tesis demostramos que el gen ortólogo de ratón, *Smo*, se encuentra sobre-expresado en linfomas linfoblásticos T inducidos mediante radiación gamma, y que este hecho supone la activación de la vía *Gli/Hh*. También demostramos la sobre-expresión del gen *SMO* en muestra humanas de Linfomas linfoblásticos T y en líneas tumorales humanas derivadas de linfomas Linfoblásticos T. Los tratamientos con un antagonista de *SMO*, la ciclopamina, tienen efectos claros en la disminución de la viabilidad y proliferación celular, alteran el ciclo celular e incluso aumentan los niveles de muerte celular por apoptosis. La sobre-expresión de este gen, produce los efectos contrarios. La sobre-expresión de *SMO* en los linfomas linfoblásticos T se puede explicar mediante la bajada de expresión de micro-ARNs específicos, que son diferentes en las muestras humanas y de ratón. Nuestros datos evidencian la importancia de la sobreexpresión de *Smoothened* en el desarrollo y/o mantenimiento de este tipo de linfomas, y sugieren que el control de la vía GLI/Hh pudiera ser una nueva estrategia de atención en el tratamiento.

The GLI/Hedgehog pathway has received increased attention, not only because of its involvement as a regulator of embryonic development but also as an oncogenic pathway. Activation of this pathway has been reported in many solid cancers and in some B-cell malignancies. However, little is known about its relevance in T-cell lymphomas. The GLI/Hedgehog pathway is mainly altered due to inactivating mutations in *PTCH*, and activating mutations in *SMO* (the only non-redundant regulator) have been found in only 10% of sporadic basal carcinoma. Here we provide evidence that the orthologous mouse gene is over-expressed in γ -radiation-induced thymic-lymphomas, and that this entails the activation of the *Gli/Hh* signalling pathway. Down-regulation of several miRNAs allows high levels of *Smo* expression. Interestingly, we also report over expression of the human gene human cell lines derived from T-cell lymphoblastic leukaemia and in primary human T-cell lymphoblastic lymphomas. Treatments of one of these cell lines with a specific SMO antagonist leads to reduced cell survival, cell cycle arrest and a striking increase of apoptosis. By contrary, over-expression of this gene produces the opposite effects. As expected the over-expression of *SMO* may be also explained by miRNA down-regulation. These findings evidence for the first time that sustained *SMO* over-expression may be critical for T-cell lymphoblastic lymphoma development, and that regulation of the GLI-Hh signalling pathway may be attractive to treat a subset of T-cell lymphoblastic lymphomas.

1. EL CÁNCER

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por la acumulación de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan a los llamados genes mayores de susceptibilidad o de alta penetrancia y a los genes menores de resistencia/susceptibilidad [1, 2]. Pero también se han descrito múltiples factores de riesgo en el desarrollo tumoral entre los que destacan la edad (por la mayor probabilidad de acumular mutaciones), la dieta, los hábitos de vida, la acción de diversos agentes externos como el tabaco, la radiación ultravioleta de la luz solar y las radiaciones ionizantes, [3-5].

Hay dos teorías básicas para explicar el origen y desarrollo del cáncer. En el modelo clásico o “modelo clonal” (FIGURA 1) se parte de una célula que sufriría una serie de alteraciones cromosómicas o mutaciones en los genes anteriormente mencionados, generándose un crecimiento clonal continuado donde cada mutación aporta una ventaja selectiva adicional que permite ir incorporando nuevas propiedades tumorales (capacidad de invasión, metástasis y resistencia a drogas). La larga lista de genes implicados ha permitido alcanzar una visión del cáncer como un grupo heterogéneo de enfermedades con diversa etiología y patogenia.

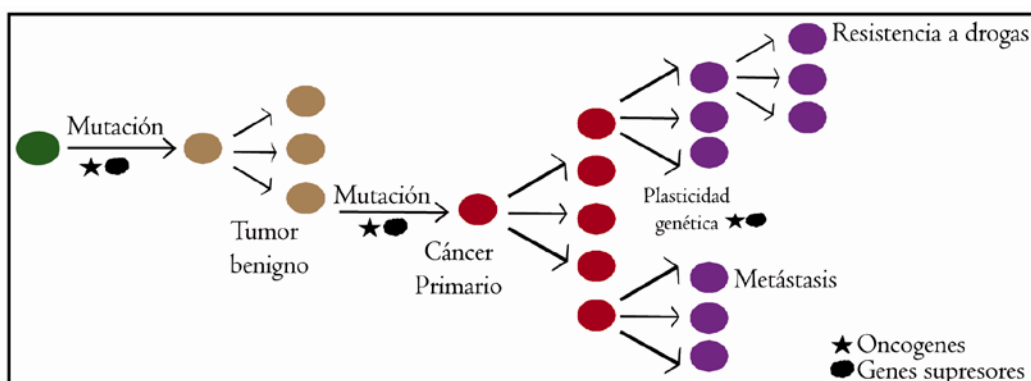


FIGURA 1: Modelo clonal de generación de cáncer (adaptado a partir de [6]).

El otro modelo alternativo incluye alteraciones “epigenéticas en las células progenitoras de tejido” (FIGURA 2) que permiten comprender la incidencia y la plasticidad de la enfermedad dependiendo de la edad y de la sensibilidad a desarrollar un cáncer mediado por el ambiente. Dichos cambios incluyen alteraciones en la metilación del ADN, ya sean la hipometilación de la citosina en las parejas de nucleótidos CpG (que es un problema generalizado con el desarrollo tumoral), como la hipermetilación de estos sitios en promotores de genes que debían expresarse normalmente. Los cambios epigenéticos incluyen también modificaciones post-traduccionales en las colas de las histonas con el cambio consiguiente en la organización de la cromatina y en la capacidad de unión de proteínas específicas. [6]

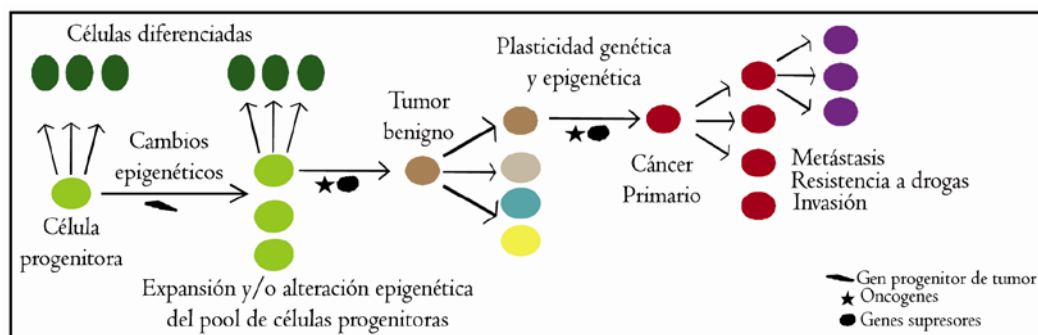


FIGURA 2: Modelo de generación de cáncer mediante cambios epigenéticos (adaptado a partir de [6]).

2. GENES MAYORES Y MENORES DE SUSCEPTIBILIDAD

Los genes mayores de susceptibilidad o genes de alta penetrancia incluyen los llamados proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación.

La activación de los proto-oncogenes sucede mediante mutaciones dominantes de ganancia de función que dan lugar a los oncogenes. Por el contrario, la inactivación de los genes supresores de tumor sucede por mutaciones recesivas que ocasionan la pérdida de función, o por silenciamiento epigenético, que consigue disminuir la actividad de dicho gen. Los genes de reparación del ADN, es decir, aquellos responsables de la reparación de errores durante la replicación del ADN o por la exposición a diferentes agentes mutagénicos, se inactivan igualmente por mutaciones recesivas o cambios epigenéticos, por lo que podrían considerarse como genes

supresores. Sin embargo su inactivación genera inicialmente cuadros de inestabilidad genética y no actúan directamente sobre el control de la proliferación o apoptosis [7].

Los genes menores de susceptibilidad o de resistencia constituirían un grupo diferente de genes, con baja penetrancia. Representarían de algún modo el fondo o *background* genético responsable de las diferencias en susceptibilidad existentes entre organismos. Podrían ser polimorfismos funcionales de los propios genes mayores (alelos hipofuncionales), pero también otros genes no implicados directamente en el control del crecimiento o la proliferación celular (metabolismo celular, reparación, respuesta inmunológica, mecanismos de carcinogénesis, respuesta a drogas, etc.) [8].

En algunos casos el cáncer puede llegar a tener un fuerte componente hereditario (Síndromes Hereditarios). En estos casos se parte de un alelo de gen mayor (normalmente un gen supresor) inactivado vía línea germinal, y el segundo alelo sufriría una segunda mutación durante el desarrollo del organismo siguiendo el modelo de “dos hits de Knudson”. Sin embargo la incidencia o gravedad de los síntomas puede variar debido a los genes menores. En el caso de tumores esporádicos, la susceptibilidad o predisposición puede también variar de unos individuos a otros incluso dentro de un mismo grupo poblacional. La identificación y caracterización funcional de los genes menores de predisposición es bastante difícil en el ser humano, por lo limitado de sus efectos, su naturaleza poligénica, por fenómenos de heterogeneidad genética, etc. Sin embargo estas tareas se están viendo enormemente facilitadas con el uso de modelos animales, sobre todo en los desarrollados en el ratón [9, 10].

3. LINFOMAS TIPO T

Las **neoplasias malignas de células T** (T-cell malignancies) se podrían clasificar en dos categorías principales: las llamados **neoplasias de células T linfoblásticas** (precursor T-cell lymphoblastic neoplasms) (generados normalmente a partir de timocitos en distintas etapas de la diferenciación intratímica) y los **linfomas T periféricos** (peripheral T-cell lymphomas, **PTCL**) (generados a partir de linfocitos T post-tímicos ya maduros). (FIGURA3) Las neoplasias de células T linfoblásticas se

caracterizan por sus células blastoideas de tamaño pequeño o mediano, de contorno redondeado o irregular y gran actividad mitótica, y porque expresan la enzima deoxi-nucleotidil-Terminal-transferasa (TdT). Se podrían diferenciar en los llamados **Leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL)** que se manifiestan como un crecimiento exacerbado de células precursoras en médula y sangre, y los **Linfomas linfoblásticos T (T-LBL)** que aparecen normalmente como una masa maligna en timo o mediastino anterior, aunque también en nódulos linfáticos, con menos del 25% de infiltración en médula. Por otro lado los Linfomas T periféricos (PTCL) forman un “pool” altamente heterogéneo de linfocitos ya maduros que deberían encargarse de la respuesta inmune celular. Se distinguen diferentes tipos dependiendo de los órganos principalmente afectados por el linfoma [11]

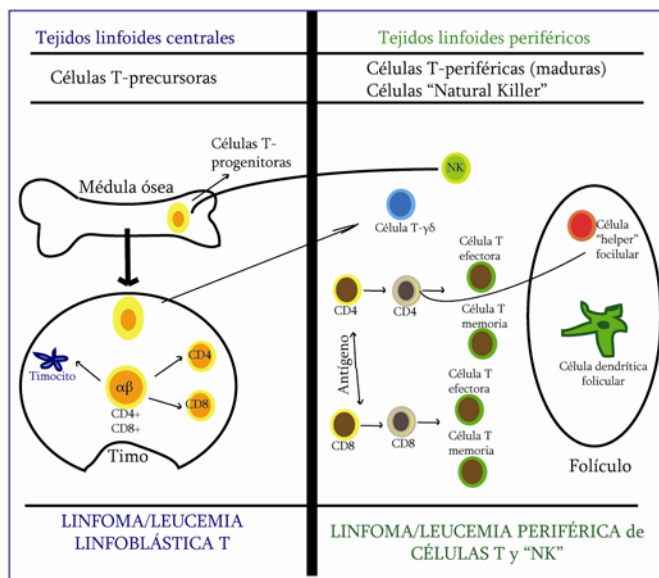


FIGURA3: Esquema representativo de los tipos de neoplasias malignas de células T. (adaptado a partir [12]).

El objetivo central de nuestro estudio son los **Linfomas linfoblásticos T**, también considerados como un tipo de **linfomas no Hodgkin (NHL)**. Constituyen un tercio de los NHL en niños pero no se trata de unas neoplasias exclusivamente pediátricas, ya que en algunas series el 50% de los casos ocurren en pacientes de más de 30 años. Suelen ser clínicamente muy agresivos, y tienen peores tasas de supervivencia y de respuesta al tratamiento que los de tipo B. Por otro lado, su gran diversidad morfológica obliga a definir muchos subtipos clínicos y no existe una buena correlación entre morfología y pronóstico [11-14]. Como se ha comentado, este tipo de linfomas se forman a partir de linfocitos inmaduros (timocitos), y habría que

distinguirlos de otro tipo de cáncer asociado al timo denominado Timoma que está asociado a las células epiteliales responsables de dirigir la maduración de los timocitos dentro del estroma tímico. [15]

El timo es un órgano linfoide central con una población mixta epitelial y linfoide, cuya misión principal es la diferenciación de los linfocitos T (FIGURA 4A y 4B). Se encuentra localizado en el mediastino antero/superior, y está recubierto por una fina cápsula que se continúa con septos fibrosos que se ramifican dividiéndolo en lóbulos más o menos definidos. Estos lóbulos están constituidos por dos áreas con clara delimitación a nivel histológico, corteza y médula, siendo la corteza más oscura por la mayor concentración de timocitos. [16]

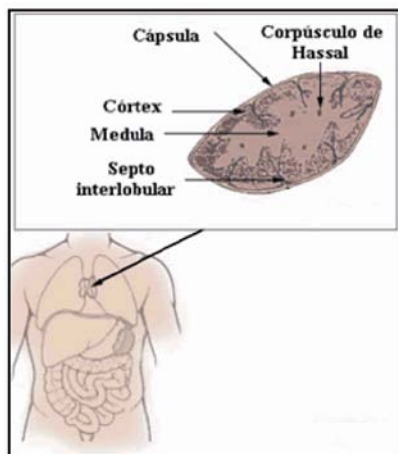


FIGURA 4A: Dibujo esquemático de la localización anatómica del timo y de su organización histológica.

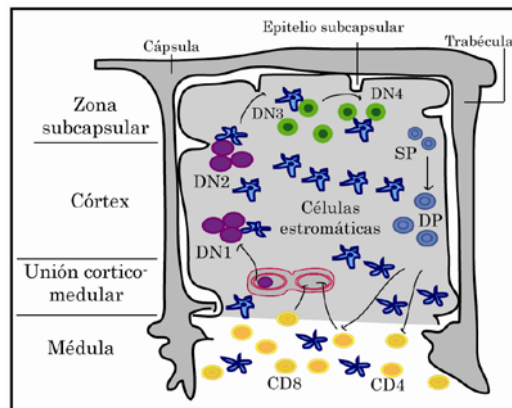


FIGURA 4B: Esquema del desarrollo y maduración de las células T en el timo (adaptado a partir [16]).

4. MODELOS ANIMALES

La extraordinaria heterogeneidad de los linfomas linfoblásticos T, la falta de correspondencia entre inmunofenotipos, pronóstico y características clínicas de la enfermedad etc., hacen pensar que la caracterización genética y molecular de cada tumor sería absolutamente necesaria para el establecimiento de un buen pronóstico y para perfilar el tratamiento más adecuado. Trabajar exclusivamente con material humano supone enfrentarse a importantes “hándicaps”, incluyendo la rareza de este tipo de tumores. Una solución deseable sería partir de buenos modelos animales para

después ir aplicando los resultados obtenidos en las muestras humanas. El modelo animal más utilizado en el estudio del cáncer y, por supuesto, en los linfomas, es el ratón. Sus ventajas radican en que los ratones son mamíferos, como el ser humano, tienen camadas numerosas, un tiempo generacional pequeño, un genoma conocido, hay disponibilidad de cepas consanguíneas con diferentes grados de susceptibilidad a los tumores, existen protocolos de inducción bien establecidos y cabe siempre la posibilidad de modificarlos genéticamente [10, 17]. Dado el alto grado de conservación entre humanos y ratones en los genes que controlan los mecanismos celulares básicos, y teniendo en cuenta el estado avanzado de secuenciación de ambos organismos, se pueden extrapolar los conocimientos adquiridos en un modelo de linfoma murino a la patología humana.

Nuestro equipo ha desarrollado en los últimos años varios modelos animales para la búsqueda de oncogenes, genes supresores y genes modificadores implicados en el desarrollo de los linfomas tímicos. El modelo para la búsqueda de genes supresores y oncogenes surgió gracias a nuestra colaboración con el Dr. Angel Pellicer (NY, University Medical School), y consiste en la inducción de este tipo de linfomas con un protocolo de radiación gamma en ratones híbridos obtenidos entre cepas consanguíneas sensibles a la inducción [2, 18]. El desarrollo de tumores espontáneos en animales es en general muy infrecuente, por lo que se deben seleccionar cepas con alta incidencia de tumores espontáneos y desarrollar procedimientos experimentales con diferentes agentes para inducir los tumores [19]. Mediante dicho protocolo se obtienen tumores que constituyen una colección relativamente homogénea de linfomas linfoblásticos de tipo T constituidos por timocitos inmaduros DN (dobles negativos o $CD4^-CD8^-$) o DP (dobles positivos $CD4^+CD8^+$) (FIGUA 5A y 5B).

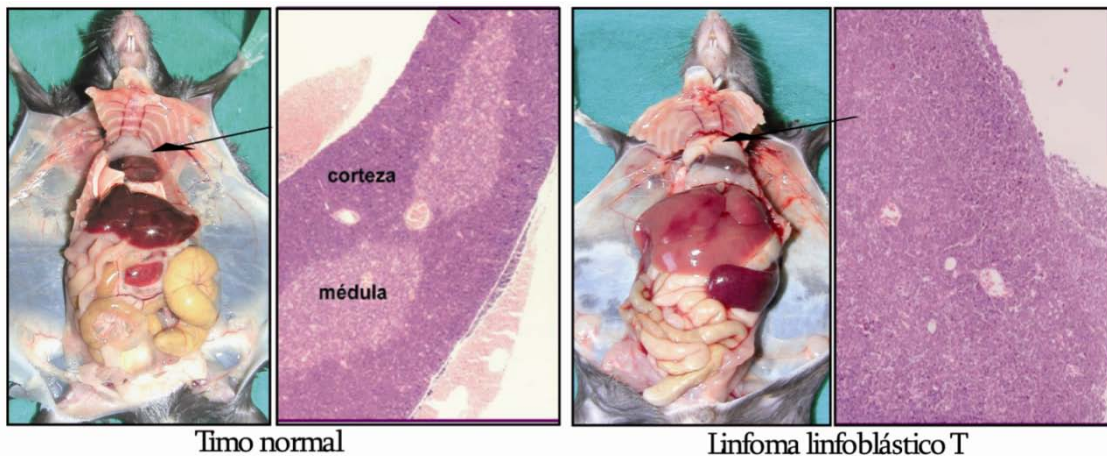


FIGURA 5A: Visión macroscópica de un timo en un ratón de la cepa C57BL/6J y **corte histológico** del mismo, en un ratón sano.

FIGURA 5B: Visión macroscópica de un timo en un ratón de la cepa C57BL/6J y **corte histológico** del mismo en un ratón irradiado que ha desarrollado un Linfoma linfoblástico T.

En nuestro laboratorio se han realizado análisis genómicos (cDNA-arrays, CGH-arrays y LOH) en modelos de ratón desarrollados en la cepa susceptible C57BL/6J, (derivada de *Mus musculus* y con un éxito en la inducción superior al 80%) que han permitido identificar genes candidatos implicados en el desarrollo de linfomas linfoblásticos de células T inducidos con radiación gamma. Una parte de estos genes operan en las células tumorales *per se*, pero otros lo hacen exclusivamente en las células estromáticas acompañantes. Si tenemos en cuenta las ocho vías de señalización que se han descrito alteradas en el desarrollo del cáncer [7] nuestro equipo habría identificado alteraciones genéticas o epigenéticas de varios genes en la vía de Retinoblastoma (*Rb*) (*Rb*, *Cyclin D1*, *p15^{ink4b}*, *16^{ink4a}*: etc) [20], [21] en la vía de *p53* (*p53*, *p19^{arf}*, *Notch1*, *p21* etc.) [22-24], en la vía de los Receptores tirosín-kinasa (RTK) (*Ras* y *Abl1*) [25, 26], en la vía de Apoptosis (*Fas/FasL*) [27, 28], en la vía de APC (*c-Myc*, *Cyclin D1* and *Cdh1/E-cadherin*) [25, 29, 30], y en la vía PI3K (*Pten*) [2, 31]. Sin embargo, aún no se ha descrito nada sobre alteraciones en algún componente de la vía GLI/Hedgehog en el desarrollo de los linfomas linfoblásticos T.

5. LA VÍA GLI/ HEDGEHOG

La vía GLI/Hedgehog (*Hh*) fue descubierta hacia 1980 en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y a partir de ahí se ha ido extendiendo su estudio hacia la mayoría de las especies tanto en invertebrados como en vertebrados. Las principales funciones con las que se le relaciona en individuos sanos son el desarrollo y morfogénesis de diferentes partes del cuerpo durante la embriogénesis, proliferación y migración celular, renovación de células troncales adultas y en regeneración y reparación de tejidos. Pero a su vez la pérdida de función de esta vía o inactivaciones inapropiadas, se han relacionado con malformaciones, iniciación y crecimiento de tumores. [32] [33]

5.1. Elementos de la vía de GLI/Hedgehog

En el caso de *Drosophila* un único ligando Hedgehog(*Hh*) se une al receptor de la vía, una proteína con múltiples dominios transmembrana, Patched (*Ptc*), el cual en la ausencia de ligando, se une a otra proteína transmembrana Smoothened (*Smo*) inactivándola. La liberación de *Smo*, tras la llegada de *Hh*, permite la trasmisión de la señal hacia el núcleo, regulando la actividad del factor de transcripción bifuncional Cubitus interruptus (*Ci*). La proteína completa de *Ci* es modificada según la presencia o ausencia de ligando. De tal forma que en ausencia del ligando *Hh*, *Ci* es proteolizado a una forma corta Ci^R que actúa como un represor transcripcional de genes. En cambio la unión de *Hh* a *Ptc*, libera a *Smo* y la forma entera de *Ci* se internaliza en el núcleo donde actúa como activador de la transcripción de varios genes relacionados con la vía, gracias al complejo que la proteína quinasa Costal2 (*Cos2*) y la proteína treonin-serin quinasa Fused (*fu*) junto con la proteína supresora de fused (*SuFu*), forman con *Smo* [34]. En vertebrados (FIGURA 6) la vía GLI/*Hh* está muy conservada, salvando alguna diferencia, de tal forma que la activación normal de la vía requiere la presencia y unión de uno de los tres miembros de la familia Hedgehog, Sonic *Hh* (*Shh*), indian *Hh* (*Ihh*) y desert *Hh* (*Dhh*), al receptor de la vía Patched (*Ptch1*) que es una proteína con 12 dominios transmembrana. Los ligandos *Hh* son sintetizados como proteínas precursoras que posteriormente son acortadas por un proceso auto-proteolítico en

proteínas más pequeñas desde el extremo amino terminal, uniéndose al extremo carboxilo terminal una fracción lipídica que permita su movilización y unión al receptor [35]. Se les considera morfógenos puesto que generan gradientes de concentración desde su lugar de secreción hasta las células receptoras. [36]. A su vez Ptch1 regula negativamente a Smo y éste regula tanto la activación de los factores de transcripción Gli (Gli1, Gli2 y Gli3) como su procesamiento y proteolización, actuando como activadores o represores de la vía. [37, 38]

La cascada de activación de la vía desde Smo hasta los factores Gli podría no estar completamente descrita, incluso en una publicación reciente [39] se piensa que hay una clara evolución en la cascada de activación de la vía en vertebrados con respecto a *Drosophila*, de tal manera que Ptch1 es capaz de activar la fosforilación de Erk1/2 en ausencia de Smo o mediante su inhibición con ciclopamina (antagonista de la vía).

Recientemente se ha descrito en el ser humano la existencia de dos proteínas transmembrana, con dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (Ig-dominio) y fibronectina tipo III, llamados CDON y BOC que actúan como co-receptores aumentando la señal cuando el ligando Hh se une a PTCH1 [36]. A su vez, para potenciar la unión del ligando, se ha descrito una proteína de superficie que se une al ligando HH llamado GAS1. En ausencia de señal, GLI1 es reprimido transcripcionalmente, GLI2 es fosforilado por GSK3 y CK1, y GLI3 es procesado como represor de la vía. Con la llegada de la señal Hh, SMO induce la activación de MAP3K10 (MST) y la inactivación de SUFU, con la consiguiente estabilización y acumulación de los factores GLI en el núcleo, donde generalmente GLI1 actúa como activador de la vía, y GLI2 y GLI3 como activadores o represores según el caso. La activación de la vía provoca el aumento en los niveles de transcripción de genes propios de la vía como *PTCH1*, *CDON*, *BOC*, *GAS1*, *GLI1*, genes relacionados con el ciclo celular como *CCND1* y *CCND2*, o genes determinantes del destino celular como *FOXA2*, *FOXC2*, *SOX13*, *TBX2*, etc [40]. Últimamente también se ha visto su implicación en el control de genes relacionados con la regulación de la muerte celular (como FAS, DR4, DR5), y con la supervivencia celular (como BCL2 y PDGFR α , regulados transcripcionalmente por GLI1 y GLI2 respectivamente) [41]

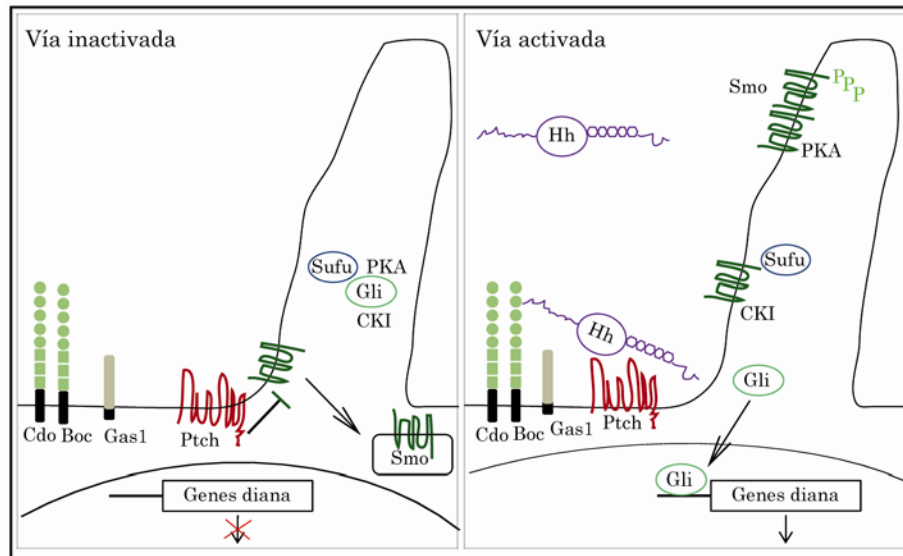


FIGURA 6: Esquema de la vía GLI/Hh en vertebrados (adaptado a partir de[35]).

5.2. Tipos de activación de la vía GLI/Hedgehog

A raíz del estudio de su implicación en cáncer se han descrito tres formas de activación diferentes de ésta vía [42](FIGURA 7):

- 1) *Activación independiente de ligando:* Suele deberse a modificaciones genéticas aberrantes en diferentes elementos de la vía como: mutaciones inactivantes, deleciones o mutaciones sin sentido en *PTCH1* o *SUFU*, mutaciones activantes en *SMO* o amplificaciones génicas o traslocaciones del gen *GLI1*.
- 2) *Activación autocrina (dependiente de ligando):* Los ligandos Hh son producidos por el mismo tipo celular que actuará como receptor de la señal. Suele darse en células tumorales o grupos pequeños de células madre cancerígenas.
- 3) *Activación paracrina (dependiente de ligando):* Suele ocurrir en el caso en que las células tumorales producen el ligando Hh, el cual afecta a células estromáticas acompañantes que responden produciendo factores de crecimiento y supervivencia.

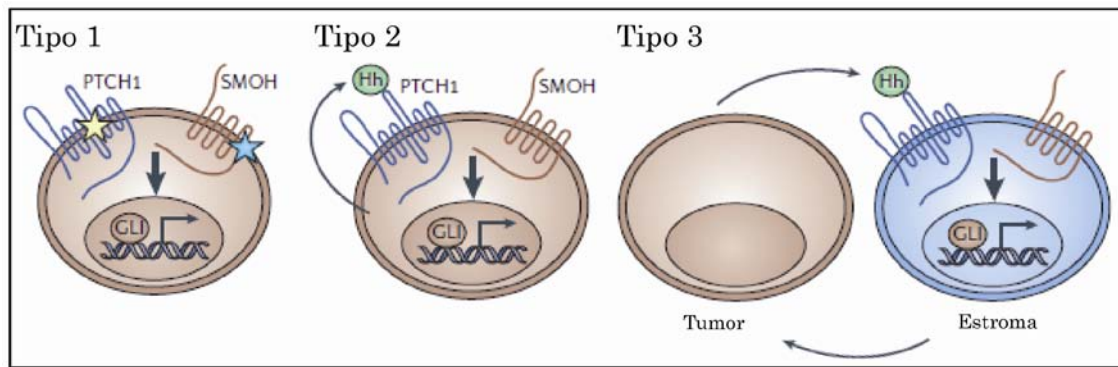


FIGURA 7: Esquema de los diferentes modelos de activación de la vía GLI/Hh (adaptado a partir de[42]).

5.3. La vía GLI/Hh en el Timo

Los diferentes componentes de la *vía GLI/Hedgehog* muestran diferentes patrones de expresión a lo largo del desarrollo del Timo. Como ejemplo significativo, la expresión de *SMO* se asocia sólo a los estadios más inmaduros de los timocitos humanos [43].

En el timo humano las células progenitoras (DN: $CD4^-CD8^-$) muestran elevados niveles de $CD34$, pero pierden $CD1a$, y son capaces de diferenciarse hacia células Natural Killer (NK), o células dendríticas (DC) o bien a un linaje de células T (pro-T-cells). Después las células progenitoras que se comprometen hacia un linaje de Células T (pre-T1 cells) expresan los marcadores $CD34^+CD1a^+DN$ y comienzan a expresar los genes RAG. A partir de aquí se diferencian en pre-T2-cells inmaduras simples positivas (ISP) mostrando los marcadores $CD4^+CD8^-$, diferenciándose luego a células pre-T3-cells doble positivas (DP: $CD4^+CD8^+$), siendo a partir de este momento cuando se produce la reordenación de las cadenas TCR β . Después de la selección- β , las células DP representan la mayor parte de células de la región cortical del timo. A continuación se produce la reordenación de la cadena TCR α pasando a ser células DP $TCR\alpha\beta^+$. Las que reconocen con baja afinidad los péptidos del complejo MHC son seleccionadas positivamente y diferenciadas hacia simples positivas (SP: $CD4^+CD8^-$ o $CD4^-CD8^+$), pasando a ocupar la zona medular del timo. En cambio, las que reconocen con alta afinidad los péptidos del complejo MHC son seleccionadas negativamente y mueren

por apoptosis. Todos estos procesos se regulan a través de vías de señalización que actúan entre células del estroma tímico y los timocitos [43].

Con respecto al timo, la vía de señalización GLI/Hedgehog regula las múltiples etapas del desarrollo de las células T. El timo es el sitio primario de producción de células T, y se sabe que la maduración y desarrollo de los timocitos se lleva a cabo mediante una interacción bidireccional entre las células T precursoras y las células epitelio-mesenquimales del estroma tímico. De hecho las células estromáticas son las principales productoras del ligando de la vía (Shh) [16]. Se sabe que el ligando Sonic hedgehog (Shh) estimula la progresión del ciclo celular en linfocitos T CD4⁺ periféricos activados [44]; que la vía de señalización modula la producción de citoquinas por los linfocitos T CD4⁺ periféricos humanos [45]; y que la vía GLI/Hh controla la celularidad en el timo y el desarrollo de los timocitos CD4⁻CD8⁻. [46]. (FIGURA 8)

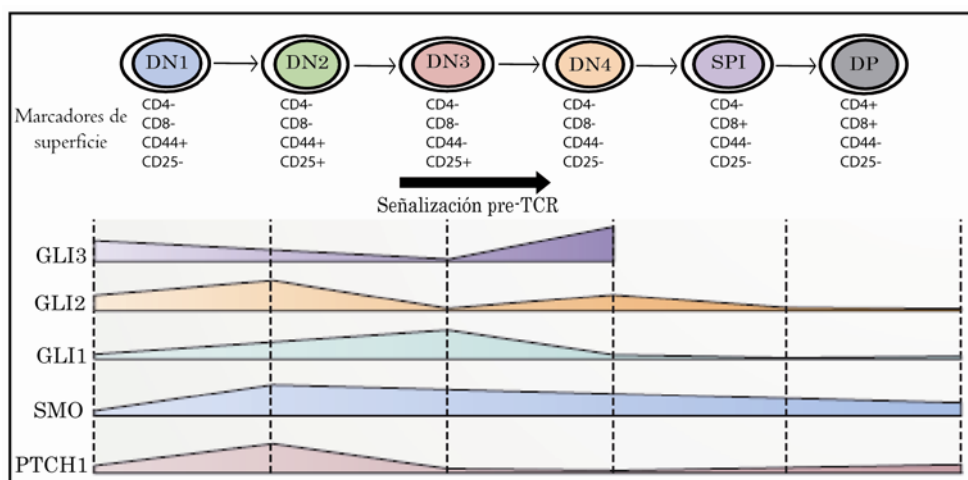


FIGURA 8: Patrones de transcripción de los diferentes elementos de la vía de Hh durante la maduración de las células T en el timo. Los diferentes estadios de maduración se definen según los marcadores de superficie que exprese el timocito durante su recorrido. (adaptado a partir de[16]).

5.4. Implicaciones de la vía Gli/Hh en cáncer

Además de su papel fisiológico, la activación de la vía GLI/Hedgehog se ha relacionado con la formación y crecimiento de diversos tipos de cánceres sólidos [42, 47-51], e incluso con el desarrollo de linfomas B [52], pero no se ha publicado nada

sobre su posible desregulación en linfomas/leucemias de células T. Se han descrito mutaciones inactivantes en el gen *PTCH1* en algunos tumores que se traducen en señalizaciones aberrantes [42]. Por otro lado, se han encontrado mutaciones activantes en el gen *SMO* (*Smoothened*) en el 10% de los Carcinomas de células basales (BCCs, *Basal Cell Carcinomas*) [53, 54]. En el ratón, existen evidencias que confirman que la sobre-expresión constitutiva de una mutación activante del gen *Smo* es capaz de inducir lesiones similares a los BCCs [54]. La sobre-expresión de esa misma mutación es capaz también de inducir linfomas B altamente proliferativos en la piel, mientras que los linfomas que no tienen ese tipo de mutación dependen, para su desarrollo, del ligando secretado por las células estromáticas de los órganos linfoides [52]. Por tanto, no es de extrañar que la inhibición de esta vía induzca apoptosis en las células del linfoma y prolongue la vida media de los ratones [55];[52]. También se han descrito niveles de expresión anormales de los genes *SHH*, *PTCH1* y *SMOH* en las fases iniciales de la formación de carcinomas pancreáticos [56]. Finalmente, la vía GLI/Hedgehog parece necesaria para mantener el compartimiento de células madre cancerígenas en Mieloma Multiple [57].

6. SMOOTHENED, EL ÚNICO ELEMENTO NO REDUNDANTE DE LA VÍA Gli/Hh

Smoothened, el único elemento no redundante de la vía de Hh, es una proteína transmembrana que pertenece a la super-familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs). Consta de siete dominios transmembrana en forma de α -hélices que se conectan por giros hidrofílicos en el exterior e interior celular, dejando un dominio amino terminal (N-terminal) y otro carboxilo (C-terminal) en cada extremo. *Smoothened* tiene un dominio N-terminal de 250 aminoácidos con un dominio rico en cisteínas (CRD) muy conservado que interviene en la unión a *Ptch1* y en su propia dimerización. El dominio C-terminal consta de 180 aminoácidos y muestra menor grado de conservación entre especies, de hecho en vertebrados es más corta que en *Drosophila* [34, 37]. Smoothened sufre varios cambios de configuración que regulan su actividad, puesto que la estimulación de su actividad tras la llegada de Hh se debe a la fosforilación en los sitios de PKA y CK1 en el extremo C-terminal cerca de

regiones ricas en residuos Arginina, permitiendo la unión a esta zona de las proteínas Cos2 y Fu. [58]

Algunos autores han descrito un dominio de autoinhibición en la cola citoplasmática del gen de *Drosophila* que contiene una zona rica en Argininas (entre los aminoácidos 661-818). Pero la llegada del ligando Hh genera fosforilaciones en regiones cercanas al “cluster” rico en Arginina de tal manera que la cola citoplasmática se expone y aproxima a la cola de otra proteína Smo formando un dímero. Por tanto adopta diferentes configuraciones según los niveles de fosforilación que vaya adquiriendo (FIGURA 9) Estos “clusters” a la vez están implicados en promover la endocitosis y degradación de Smo, y su efecto se ve neutralizado por múltiples fosforilaciones que promuevan su reciclado hacia la membrana [59]. En vertebrados la forma activa de Smo se encuentra en el cilio y cuando se inactiva se internaliza [35, 59].

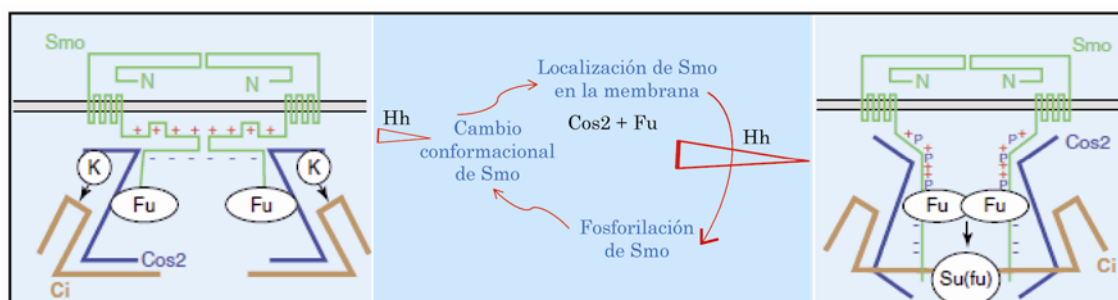


FIGURA 9: Esquema de los diferentes estados conformacionales que adopta la proteína Smo según su grado de fosforilación (adaptado a partir de [58]).

La estabilidad transcripcional de algunos elementos de la vía Hh, como es el caso de *Smo*, *Cos2* y *Fu*, se ha visto en *Drosophila* que está afectada por un aumento de los niveles de transcripción de tres microRNAs (miRNAs) incluidos en un mismo “cluster” [60]. Esta misma forma de regulación se ha descrito en humanos, donde se han identificado diferencias de expresión de determinados genes comparando tejidos sanos con tejidos tumorales. Y se han descrito claras diferencias en los patrones de

expresión de los diferentes miRNAs descritos, según el tipo tumoral siendo un claro motivo de diagnóstico [61].

7. LA VIA GLI/HH EN LINFOMAS LINFOBLÁSTICOS T DE RATÓN INDUCIDOS POR RADIACIÓN GAMMA.

Como se mencionó con anterioridad nuestro equipo ha venido trabajando desde hace algunos años en el análisis genético de linfomas linfoblásticos T de ratón inducidos con radiación gamma, y ha encontrado evidencias de alteraciones genéticas y/o epigenéticas en todas las vías de señalización características del cáncer con excepción de la vía GIL/Hedgehog. Sin embargo, nuestros análisis se han completado recientemente con aproximaciones genómicas que incluyen micromatrices (*microarrays*) de ADNc y BACs, realizadas en colaboración con el Dr. Marcos Malumbres (CNIO). Los resultados están depositados en GEO DataSets (GSE10891 record) y han sido recogidos en dos publicaciones recientes [26] (María J. Bueno et al., Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway *Blood* 2011 *blood-2010-10-315432*; *published ahead of print April 8, 2011*, doi:10.1182/blood-2010-10-315432). Curiosamente, una análisis preliminar de las micromatrices de expresión indicaba la posible sobre-expresión de *Smoothed* (el único regulador no-redundante de la vía de señalización *GLI/hedgehog*).

OBJETIVOS

A la vista de los datos preliminares disponibles, que indican que *Smoothened* parece ser el único componente de la vía GLI/Hh con expresión alterada en linfomas linfoblásticos T inducidos con radiación gamma, los objetivos de esta tesis han sido:

- 1.- Confirmar la sobre-expresión del gen *Smoothened* apuntada en los *micro-arrays* de Linfomas Linfoblásticos T de ratón inducidos con radiación gamma, determinando los niveles de RNAm y proteína en linfomas de ratón, así como en muestras humanas de Linfomas Linfoblásticos T y en Líneas celulares humanas derivadas de Leucemias/Linfomas Linfoblásticos T.
- 2.- Comprobar si la sobre-expresión del gen *Smoothened* es capaz de inducir la activación de la vía *GLI/Hedgehog*.
- 3.- Comprobar si la inhibición de *Smoothened* en células tumorales que sobre-expresan esta proteína se traduce en cambios significativos en los niveles de proliferación celular, viabilidad celular, ciclo celular o apoptosis.
- 4.- Identificar los posibles mecanismos de regulación de la expresión del gen *Smoothened*, tanto en el caso de los linfomas murinos como en los linfomas linfoblásticos T humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Inducción de linfomas T murinos

Los linfomas/leucemias linfoblásticos de tipo T se indujeron en ratones de cinco semanas de la cepa C57BL/6J, mediante irradiación en cuatro dosis de 1.75 Gy (una a la semana) utilizando una fuente de ^{137}Cs (FIGURA 10). La radiación gamma es un tipo de radiación ionizante que puede provocar mutaciones puntuales en el ADN, aunque su principal efecto son las roturas de cadena doble que tienen como resultado la inducción de una alta tasa de reordenaciones y deleciones cromosómicas. Este tratamiento se llevó a cabo en la unidad del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM) con el equipo IBL-437C. Los ratones fueron chequeados periódicamente durante un periodo de latencia de 25 semanas, para ver si mostraban síntomas de la enfermedad: letargia, pelaje alborotado, respiración entrecortada, o postura encorvada. Cuando los ratones mostraban uno o varios de estos signos, se sacrificaban, y sus órganos – al menos timo, hígado y bazo – eran extraídos.

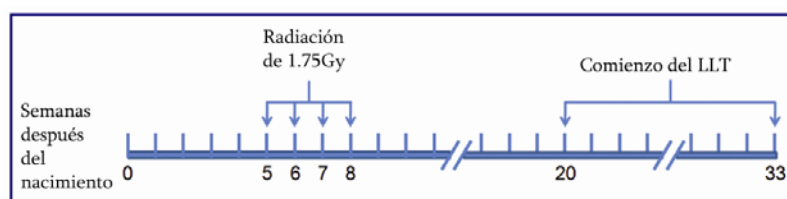


FIGURA 10: Esquema representativo en semanas del proceso de inducción de Linfomas Linfoblásticos T (LLT) en ratones de la cepa C57BL/6J mediante radiación gamma.

Las características de los linfomas linfoblásticos T (LLT) murinos utilizados, y su código de denominación se indican en la siguiente tabla (Tabla 1). En resumen, se utilizaron 20 tumores procedentes de ratones de la cepa C57BL/6J, de los cuales 5 eran machos y 15 hembras:

Muestra	Cepa	Sexo
I6CGI	C57BL/6J	macho
I6CGI49	C57BL/6J	macho
6GC-I6I	C57BL/6J	hembra
6CG-I62	C57BL/6J	hembra
6CG-I49	C57BL/6J	hembra
B6-6I0	C57BL/6J	hembra
B6-634	C57BL/6J	hembra
B6-699	C57BL/6J	hembra
B6-700	C57BL/6J	hembra
B6-703	C57BL/6J	hembra
H3H L3	C57BL/6J	hembra
H3H L9	C57BL/6J	macho
H3H L22	C57BL/6J	hembra
H3H L27	C57BL/6J	macho
H3H L45	C57BL/6J	macho
H4-II	C57BL/6J	hembra
NRH7-5	C57BL/6J	hembra
SSL4	C57BL/6J	hembra
SSL13	C57BL/6J	hembra
SSL25	C57BL/6J	hembra

TABLA 1: Características de las muestras de LLT murinos usados para cada uno de los ensayos.

2. Muestras de pacientes

Se han analizado un total de 21 muestras de linfomas linfoblásticos T humanos, proporcionadas por la Unidad del Banco de Tumores del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) (Referencia RNBdT 09/47). Las características de los pacientes y su código de denominación se indican en la tabla (Tabla 2).

Muestra	Organo afectado	Diagnóstico patológico
T1	Mediastino	Linfoma linfoblastico T
T2	Mediastino	Linfoma linfoblastico T
T3	Mediastino	Linfoma linfoblastico T
T4	Mediastino	Linfoma linfoblastico T
T5	Adenopatía Laterocervical	Linfoma linfoblastico T
T6	Ganglio linfático cervical	Linfoma linfoblastico T
T7	Ganglio	Linfoma linfoblastico T
T8	Ganglio	Linfoma linfoblastico T
T9	Mediastino	Linfoma linfoblastico T
T10	Ganglio linfático	Linfoma linfoblastico T
T11	Ganglio linfático	Linfoma linfoblastico T
T12	Ganglio linfático	Linfoma linfoblastico T
T13	Ganglio	Linfoma linfoblastico T
T14	Ganglio linfático	Linfoma linfoblastico T
T15	Ganglio linfático	Linfoma linfoblastico T
T16	Ganglio linfático	Linfoma linfoblastico T
T17	Mediastino	Linfoma linfoblastico T
T18	Bazo	Linfoma linfoblastico T
T19	Ganglio cervical	Linfoma linfoblastico T
T20	Adenopatía inguinal izquierda	Linfoma linfoblastico T
T21	Timo	Linfoma linfoblastico T

TABLA 2: Características de las muestras de LLT humanos usados para cada uno de los ensayos.

3. Líneas celulares

En este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares:

Una línea celular derivada de fibroblastos embrionarios de ratón, **NIH-3T3**, cultivada en medio con D-MEM (GIBCO) + L-Glutamina (L-Gln, 2 mM) suplementado con 10% FBS, Ampicilina (0.1 mg/ml), Gentamicina (64 µg/ml) y Fungizona (2.5 µg/ml).

Varias líneas celulares humanas derivadas de linfomas linfoblásticos T cultivadas en las siguientes condiciones: Para **JURKAT** (SP CD4+ TCR a/b +) se utilizó RPMI 1640 + L-Gln (2 mM) suplementado con 10% FBS, Penicilina (100 µg/ml), Estreptomycin (100 U/ml) y Fungizona (2.5 µg/ml). Para **MOLT-4** (CD3+ CD4+ CD8+ TCR a/b-) y **PEER** (CD3+ CD4+ CD8+ TCR a/b +) se utilizó RPMI 1640 + L-Gln (2 mM)

suplementado con 20% FBS, Penicilina (100 µg/ml), Estreptomina (100 U/ml) y Fungizona (2.5 µg/ml). Todas ellas obtenidas a partir de la casa comercial German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ).

Una Línea humana de timocitos inmortalizados con el virus saimiri (**T.H**) (proporcionada por el Dr. José R Regueiro de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid), cultivada en un medio con 1:1 de Panserin 401 (Pan Biothech GMBH) y RPMI 1640, suplementado con 10% FBS, Penicilina (100 µg/ml), Estreptomina (100 U/ml), L-Gln (2 mM) e Interleuquina-2 (IL2, 40-80 units/ml, Sigma).

Varias líneas celulares humanas derivadas de linfomas T cedidas por el Dr.M.A.Piris (CNIO) crecidas en los siguientes medios de cultivo: Para **HH**, **HUT78** y **SR786**, RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, Penicilina al 1% y Estreptomina al 1%. Para **MJ**, IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) suplementado con 10% FBS, Penicilina al 1% y Estreptomina al 1%. Para **Der17**, RPMI 1640 suplementado con 20% FBS, Penicilina al 1%, Estreptomina al 1% e IL-2 a 20ng/ml (Sigma). Todas las células se mantuvieron en condiciones de 5% CO₂ y 37 °C.

4. Extracción de ácidos nucleicos y proteínas

Se utilizaron 31 individuos de la cepa C57BL/6J, de los cuales 11 sirvieron como control (no irradiados), y los 20 restantes correspondían a individuos que habían desarrollado el tumor durante el período de latencia tras el protocolo de irradiación (el criterio establecido es que el timo pese 100 mg ó más). En ambas poblaciones se extrajo el ARN empleando el protocolo TriPure™ (Roche). La validez de los ARNs extraídos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con formaldehído y la calidad del ARN se evaluó utilizando el sistema BioAnalyzer (Agilent) (del servicio de genómica del CBMSO). El ADN y las proteínas de estas muestras se extrajeron a partir del sobrenadante generado en la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del mismo fabricante. Las concentraciones de ADN y ARN se determinaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND-1000 del servicio de genómica del CBMSO) y la cuantificación de las proteínas se hizo mediante el método colorimétrico *BCA™ Protein Assay* (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante,

con albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA) como referencia estándar. Este método se basa en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas en un medio alcalino. La unión del Cu^{+1} con las moléculas de BCA da lugar a una reacción coloreada cuya absorbancia puede ser medida a 562nm.

En el caso de extracción de ARN y proteínas de cultivos celulares, en algunos casos se extrajeron empleando el protocolo TriPure™ (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante y en otros los lisados de proteínas obtenidos a partir de células se hizo utilizando el tampón de lisis de células RIPA Cell Lysis buffer (NaCl 150 mM, Tris HCl 50 mM pH 8, Desoxiclorato sódico al 0,5%, dodecilsulfato sódico al 0,1%, NP-40 (IGEAL CA-630) al 1% y agua destilada) y las cantidades recomendadas de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma, St.Luis, Mo), cóctel de inhibidores de fosfatasas (Sigma, St.Luis, Mo) e Inhibidor de Serín-proteasas, Cisteín-proteasas y Acetilcolinesterasas (PMSF). Las proteínas se cuantificaron mediante el método colorimétrico BCA™ Protein Assay (Pierce) y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

5. Secuenciación del gen *Smoothened*

Partiendo del ARN total de cada muestra se obtuvo el ADNc correspondiente mediante transcripción inversa, utilizando el *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)*. En base a la secuencia de ADNc de *Smo* publicada previamente (Nº Acceso de Genbank: NM_176996) se diseñó una pareja de cebadores para amplificar específicamente el ADNc de este gen mediante PCR (FIGURA 11). Esta misma pareja de oligonucleótidos sirvió también para clonar el ADNc de *Smo* en el vector *pcDNA3* (Invitrogen): **Smo-Hind-M-F: 5' AAGCTTTTGGCTGAGTTGGCTGTTTG 3' y Smo-Eco-M-R: 5' GAATTCATTGTCTTTCCCATCCTA 3'.**

Las condiciones de PCR fueron las siguientes (concentraciones y cantidades finales):

- Volumen final = 50 μ l
- FastStart High Fidelity Enzyme Blend = 2.5 U
- Buffer de la polimerasa, que contiene: [MgCl] = 1.8 mM. C_F = 1x.
- [DMSO]= 4%
- [dNTPs] (Mix) = 200 μ M
- [Cebadores] = 0.4 μ M
- ADN = 200 ng
- Ciclos: 95°C, 2 minutos; 35 ciclos (95°C, 30 seg; 51°C, 30seg; 72°C, 2 min); 72°C, 10 minutos.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% con Bromuro de etidio en TBE y fueron visualizados con luz ultravioleta.

Puesto que la secuencia del ADNc es muy larga (2382 pb), se optó por diseñar una pareja adicional para realizar con mayor seguridad su secuenciación: **SmoM-intF: 5' TCTGCACGCTCTTCACACTG 3'** y **SmoM-intR: 5' TCTTGGGCTCATCATCACTG 3'**

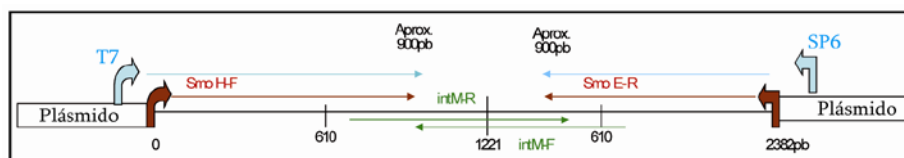


FIGURA 11: Esquema de la unión y funcionamiento de cada uno de los oligonucleótidos diseñados para secuenciar y amplificar el ADNc de *Smo*.

Para la secuenciación, el ADN fue purificado utilizando el método de *QIAquick kit* (Qiagen). La comparación entre las secuencias obtenidas y la publicada se hizo mediante el programa *L-Align* de *Expasy Molecular Biology Server*.

El mismo procedimiento fue utilizado para amplificar y secuenciar el ADNc de *SMO* humano (2364pb), tanto en las líneas celulares como en las muestras procedentes de los linfomas humanos. A partir de la secuencia previamente publicada (Nº Acceso de Genbank NM_005631), se diseñó la siguiente pareja de cebadores (FIGURA 12), que sirvió también para clonar el ADNc de *Smo* en el vector *pcDNA3* (Invitrogen): **SMO-Hind-H-F: 5' AAGCTTTTGTCTGAGTTGGCGGGTT3'** y **SMO-EcoH-R: 5' GAATTCTAGGGAAGCATGCTCGGTGA 3'**

Las condiciones de PCR fueron las siguientes (concentraciones y cantidades finales):

- Volumen final = 50 μ l
- FastStart High Fidelity Enzyme Blend = 2.5 U
- Buffer de la polimerasa, que contiene: [MgCl] = 1.8 mM. C_f = 1x.
- [DMSO] = 6%
- [dNTPs] (Mix) = 200 μ M
- [Cebadores] = 0.4 μ M
- ADN = 200 ng
- Ciclos: 95°C, 2 minutos; 35 ciclos (95°C, 30 seg; 57°C, 30seg; 72°C, 2 min); 72°C, 10 minutos.

Para la secuenciación completa de todo el ADNc, se diseñó además la siguiente pareja de cebadores intermedios: **SMOH-int-F: 5' ACAGCTACATCGCGGCCTTC 3'** y **SMOH-int-R: 5' TCCAGACCCAGGTGCTCATG 3'**

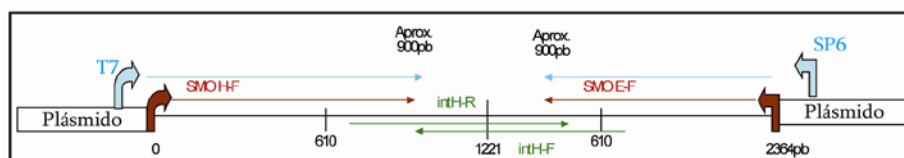


FIGURA 12: Esquema de la unión y funcionamiento de cada uno de los oligonucleótidos diseñados para secuenciar y amplificar el ADNc de *SMO*.

El mismo procedimiento fue utilizado para amplificar y secuenciar la región no codificante 3'UTR del gen *Smo* de ratón (1074pb), a partir de una muestra de timo de un ratón sano control. A partir de la secuencia previamente publicada (Nº Acceso de Genbank NM_005631), se diseñó la siguiente pareja de cebadores (FIGURA 13), que incluyen la diana para la enzima de restricción XbaI (incluida dentro de la región de clonaje múltiple de los vectores que se usaron para su clonaje) y que sirvió también para clonar la región 3'UTR de *Smo* en el vector *pcDNA3* (Invitrogen) y *pGL3-control* (Promega): **MSmo3UTR-F: 5'-TCTAGATGGATGCAGACTCGGACTTC-3'** y **MSmo3UTR-R: 5'-TCTAGATATACAAAAATGTTTTATTT-3'**

Las condiciones de PCR fueron las siguientes (concentraciones y cantidades finales):

- Volumen final = 50 µl
- FastStart High Fidelity Enzyme Blend = 2.5 U
- Buffer de la polimerasa, que contiene: [MgCl] = 1.8 mM. C_f = 1x.
- [DMSO] = 0%
- [dNTPs] (Mix) = 200 µM
- [Cebadores] = 0.4 µM
- ADN = 200 ng
- Ciclos: 95°C, 2 minutos; 35 ciclos (95°C, 30 seg; 54°C, 30seg; 72°C, 2 min); 72°C, 10 minutos.

Para la secuenciación completa de la región 3'UTR del gen *Smo* se usaron diferentes cebadores dependiendo del vector en el que estuviese clonado. En el caso del clonaje de la región 3'UTR del gen *Smo* en el vector *pcDNA3* (Invitrogen) se usaron los iniciadores T7 y SP6 del servicio de secuenciación bien del CNIO o bien del Parque Científico. En el caso del clonaje en un vector *pGL3-control* (Promega) se diseñó la siguiente pareja de iniciadores: **Fwd: 5'-CGGAAACTCGACGCAAG-3'** y **Rev: 5'-CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC-3'**.

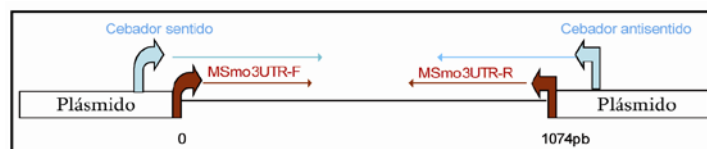


FIGURA 13: Esquema de la unión y funcionamiento de cada uno de los oligonucleótidos diseñados para secuenciar y amplificar la región 3'UTR del gen *Smo*.

6. Clonaje del ADNc de *Smo* de ratón y *SMO* humano

Como se ha podido comprobar, las parejas de cebadores diseñadas para amplificar el ADNc de *Smo* de ratón y del *SMO* humano, incluyen sitios de restricción distintos en cada extremo: *HindIII* y *EcoRI*. Estas enzimas no cortan dentro del ADNc, y sus sitios de restricción están presentes en el sitio de clonaje múltiple del plásmido *pcDNA3* (Invitrogen).

Una vez secuenciados los ADNc con las condiciones de PCR indicadas anteriormente, se digirieron doblemente los productos amplificados con *HindIII* y *EcoRI*, para clonarlos en el plásmido *pcDNA3* (Invitrogen) (FIGURA 14), siguiendo las instrucciones del fabricante (ROCHE). Las construcciones serán denominadas de aquí en adelante: m*Smo*-*pcDNA3* (*mouse Smo*, *Smo* de ratón) y h*SMO*-*pcDNA3* (*human SMO*, *SMO* de humano).

En el caso de la región 3'UTR del gen *Smo* de ratón el clonaje, tanto en el vector *pcDNA3* (Invitrogen) como en el vector *pGL3-control* (Promega) (FIGURA 14), se realizó mediante una digestión simple con la enzima de restricción *XbaI* (siguiendo las instrucciones del fabricante, Roche) seguido de un tratamiento de desfosforilación con Fosfatasa Alcalina (rAPID Alkaline Phosphatase, ROCHE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

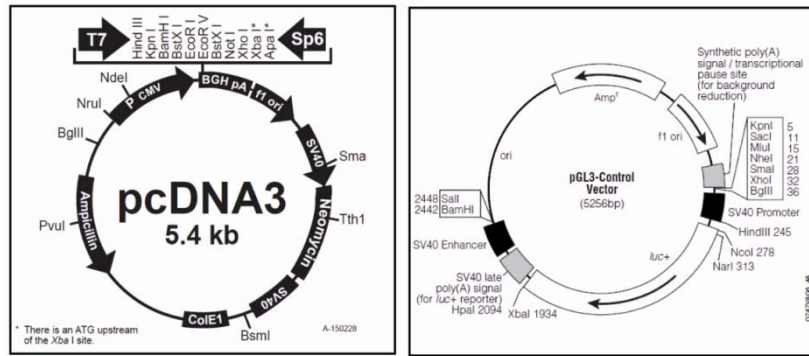


FIGURA 14: Mapas de los vectores de clonaje pcDNA3 (Invitrogen) y pGL3-control (Promega).

En el caso de la región 3'UTR de *SMO*, obtuvimos la construcción 3'UTR *SMO* Reporter Vector (Product.ID S207779) (FIGURA 15) de la casa comercial SwitchGear Genomics. El vector está basado en el vector pGL3 de Promega, utilizado en el caso de la región 3'UTR de ratón, y por tanto esta construcción es compatible con los kits utilizados previamente (*Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega)).

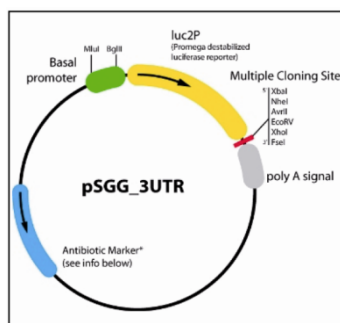


FIGURA 15: Mapa del vector de clonaje pSGG_3UTR (SwitchGear Genomics).

7. Mutagénesis dirigida

Para mutar específicamente el 3'UTR de *SMO* (Mutación I) se diseñaron oligonucleótidos (FIGURA 16) para mutar cuatro nucleótidos situados en la región complementaria a la región denominada “seed sequence” situada en el extremo 5' del miR-193 (FIGURA 17).

Nombre		Secuencia (5'-3')
Mutación I	Sentido	GTTCCCAGAGTGGGCTTCGGCGGGCCGGGAGGCAGCC
	Antisentido	GGCTGCCTCCCGGCCCGCCGAAGCCCACTCTGGGAAC

Fig.16: Cuadro resumen de los oligonucleótidos usados para mutar la región 3'UTR de *SMO* clonada en el vector pSGG_3'UTR.

Tanto el diseño de los oligonucleótidos como el ensayo de mutagénesis se realizaron mediante el kit QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

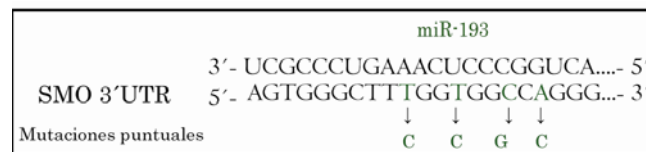


FIGURA 17: Mutaciones puntuales en la región 3'UTR de *SMO*. Las flechas indican los cuatro nucleótidos mutados en la construcción del plásmido 3'UTR *SMO* Reporter Vector, según la zona de máxima complementariedad entre el miRNA y 3'UTR de *SMO*.

8. Tratamientos de cultivos celulares

Para la realización de algunos de los ensayos se trató a las células con un inhibidor de la proteína Smoothed denominado Ciclopamina (KAAD-CyclopamineToronto Research Chemicals Inc. TRC)[62-64] a diferentes concentraciones y tiempos según el ensayo y como control de éste se trató de forma paralela a las células con DMSO (Sigma). Se usó también otro alcaloide que no tiene ningún efecto sobre *SMO*, la Tomatidina (Sigma T2909), a la concentración de 10uM durante el tiempo estimado en el ensayo [65, 66]. Para el tratamiento con SHH (Recombinant Human Sonic Hedgehog, PEPROTECH) [35, 47, 56] ligando de la vía Hh, se añadió Shh a una concentración de 500ng/ml al medio y se dejó durante 24h.

9. Transfecciones transitorias

Para los ensayos luciferasa en células Jurkat, éstas se cultivaron en su medio correspondiente y cuando estaban con un mínimo de 90% de confluencia fueron co-transfectadas con *pRL-TK Vector (Promega)* y la construcción *Gli-Luciferase-pGL2* (cedida amablemente por la Dra. Pilar Santiesteban del Instituto de Investigaciones Biomédicas, IIB), utilizando *LipofectamineTM Reagent y PlusTM Reagent (Invitrogen)*. Se utilizó una razón ADN:Lipofectamina de 1:2,5 (0.4 µg : 1 µl), y el medio sin suero OptiMEM (Invitrogen). A las tres horas se sustituyó el medio de la transfección por medio completo con suero. Se realizaron diferentes ensayos combinando la presencia/ausencia de Ciclopamina, inhibidor específico del gen *Smoothened*, [67, 68], a distintas concentraciones 2 µM, 5 µM y 10 µM.

Para los ensayos Luciferasa en células NIH-3T3, éstas se cultivaron en su medio correspondiente y cuando estaba con un mínimo del 90% de confluencia fueron transfectadas, al día siguiente de sembrarlas, con los vectores siguientes en diferentes combinaciones, en el caso del ensayo luciferasa con la región 3'UTR del *Smo* en ratón, el vector vacío pGL2 (Promega) como control, la construcción pGL3-*mSmo3'UTR*, el vector *pRL-TK (Promega)* que contiene la luciferasa de Renilla, como control el vector vacío denominado *Scramble-miRNA* o *miRVec (CNIO)* y las diferentes construcciones de cada microRNA ("miRNA-vector"), utilizando *LipofectamineTM Reagent (Invitrogen)*. En el caso del ensayo luciferasa con la región 3'UTR del *SMO* en humano, se usó una construcción que contenía la región 3'UTR de *SMO* clonada en el vector 3'UTR Reporter Vector de SwitchGear. Para la transfección se utilizó una razón ADN:Lipofectamina de 1:2,5 (0.4 µg : 1 µl) y medio sin suero OptiMEM (Invitrogen). A las cinco horas, se sustituyó el medio de la transfección por medio completo con suero. En los ensayos de mutagénesis se procedió de igual manera, pero en este caso en vez de usar el vector 3'UTR *SMO* Reporter Vector de SwitchGear, se usó la versión mutada de éste en la región de unión del miRNA hsa-miR-193.

Para los ensayos de expresión de *Smo* tras la sobre-expresión de diferentes miRNAs en células NIH-3T3, éstas se cultivaron en su medio correspondiente y cuando

estaba con un mínimo del 90% de confluencia fueron transfectadas, al día siguiente de sembrarlas, como control el vector vacío (*Scramble-miRNA*, *CNIO*) y las diferentes construcciones de cada microRNA ("miRNA-vector"), utilizando *LipofectamineTM Reagent* (Invitrogen). Para la transfección se utilizó una razón ADN:Lipofectamina de 1:2,5 (0.4 µg : 1 µl) y medio sin suero OptiMEM (Invitrogen). A las cinco horas, se sustituyó el medio de la transfección por medio completo con suero.

Para los ensayos expresión de *SMO* tras la sobre-expresión de diferentes miRNAs en células Jurkat, se procedió a su transfección mediante electroporación. En este caso se necesitan 10 millones de células por punto de transfección, se centrifugan a 1000rpm durante 5 min y resuspenden en 400ml de medio RPMI con 20% de suero (FBS). Se añaden 20ug del ADN que se vaya a electroporar y se somete a una pulso de electroporación a 960µF, 260V para resuspender en 10 ml de RPMI con 20% de suero (FBS) y se deja en el incubador durante 24-48h a 37°C, y a un % de CO₂. Se transfectó el vector EGFP-N1 (servicio microscopía CBMSO) como control, y con las construcciones *Scramble-miRNA* (*CNIO*) como vector vacío control y las diferentes construcciones de cada miRNA miRNA-vector (*miRVec*, *CNIO*).

10. Western-Blots

Mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante) al 8% se separaron alícuotas de 30ug de los lisados proteicos. Posteriormente, se electrotransfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) durante 2h a 4°C a 400mA (amperaje constante) con agitación. Para la inmunodetección de la proteína Smoothened tanto en ratón como en humano se usó el Anticuerpo policlonal Smoothened Drosophila Homolog (SMOH) de conejo anti-ratón y anti-humano (MBL International Corporation). Como anticuerpo secundario se usó el anticuerpo policlonal anti-conejo IgG conjugado con HRP (Cell Signaling Technology). Como control de carga, en el caso de ratón se utilizó la β-actina monoclonal (AC 15 Sigma) y en el caso de humano la α-tubulina monoclonal (DM 1A Sigma) o la GAPDH (mAb(1D4) ENZO life sciences) En ambos casos el anticuerpo secundario que se usó fue un anti-ratón conjugado con HRP (GE).

Puesto que todos los anticuerpos secundarios llevaban acoplados la peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase), el revelado se hizo mediante el método ECL (GE Amersham).

11. Ensayo Luciferasa

La actividad luciferasa se determinó mediante el *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) 24 o 48 horas después de completada la transfección. Para normalizar el ensayo en ambos casos, se empleó el plásmido *pRL-tk Renilla normalizing luciferase vector* (Promega). Las actividades, Luciferasa y Renilla, se monitorizaron utilizando un luminómetro *Sirius* (Berthold) del CBMSO. La actividad luciferasa se determinó como la razón normalizada Luciferasa / Renilla, relativizada con respecto a la del vector *pGL2* vacío.

12. Ensayos de viabilidad con 7AAD

Se cultivaron células Jurkat, bien sin tratar o bien tratadas con Ciclopamina 10 μM o DMSO 10 μM , durante 5 días mediante citometría de flujo (FACSCalibur de Becton Dickinson, CBMSO) se estableció la variación diaria de la señal del 7-amino-Actinomycin D (7-ADD-BD Pharmingen) añadido 15 min antes de la medición a relación de 5 μl de 7ADD/100 μl de muestra. El 7-AAD tiñe los ácidos nucleicos permitiendo excluir las células que no sean viables dentro del cultivo.

13. Ensayos de proliferación con CFSE

Se trataron células Jurkat con el reactivo CellTraceTM CFSE Cell Proliferation kit (Molecular Probes), también llamado carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester, durante 15min a 37°C a una concentración de 2 μM , y después se lavaron 3 veces con medio nuevo para eliminar los restos del reactivo. A continuación se cultivaron esas mismas células, bien sin tratar o bien tratadas con Ciclopamina 10 μM o DMSO 10 μM , durante 5 días mediante citometría de flujo (FACSCalibur de Becton Dickinson, CBMSO) se estableció la variación diaria la señal del CFSE a medida que se había ido dividiendo el cultivo. Las células al principio del tratamiento son marcadas de tal manera que se formen aductos entre el ADN y el reactivo CFSE y dicha marca es transmitida de células madres a hijas, división tras división, diluyéndose la señal en cada división celular.

14. Ensayos TUNEL

Se cultivaron también células Jurkat y se realizaron diferentes ensayos añadiendo Ciclopamina a distintas concentraciones 2 μ M, 5 μ M y 10 μ M. Las células se fijaron 24 y 42 horas después del tratamiento, con Formaldehído (Panreac) 3.7%, se permeabilizaron con Tritón X-100 (Fluka) Citrato Sódico 0.1%, y se guardaron en PBS a 4°C hasta su incubación con la solución de TUNEL (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células apoptóticas (positivas para TUNEL, aquellas células marcadas con dUTP en las roturas de las hebras del ADN) se determinó por citometría de flujo, analizando 25.000 células individuales o eventos por muestra en el Servicio de Citometría del CBMSO (FACSCalibur de Becton Dickinson)

15. Estudio del Ciclo Celular

Se trataron células Jurkat con Ciclopamina a concentraciones 2 μ M, 5 μ M y 10 μ M. Las células se fijaron 24 y 48 horas después del tratamiento con Etanol al 70%, se trataron con RNasa (10 mg/ml) y se tiñeron con Ioduro de Propidio (Servicio de Microscopía del CBMSO). El porcentaje de células en cada etapa del ciclo celular se determinó por citometría de flujo, analizando 10.000 células individuales o eventos por muestra en el Servicio de Citometría del CBMSO (FACSCalibur de Becton Dickinson).

16. Inmunofluorescencia

Se fijaron células Jurkat (300.000 células por cubre en un volumen final de 50ul) en cristales pre-tratados con 30ul/cubre de poli-L-Lys 50ug/ml en PBS durante 2 horas a 37°C, durante 15min a temperatura ambiente. Se fijaron con Formaldehído (Panreac) al 4% en PBS durante 10min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS para eliminar los radicales libres del formaldehído. A continuación se permeabilizaron con Tritón-X100 (Fluka) al 1% durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras un lavado con PBS se procedió al bloqueo con BSA (Sigma) al 1% durante 1hora a temperatura ambiente. La incubación con las diferentes combinaciones de anticuerpos, en una cámara húmeda y con 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBS entre incubaciones, fue la siguiente, el anticuerpo primario para SMO (MBL Internacional Corporation) se usó a una dilución 1:50 en PBS en un volumen final de 50ul durante toda la noche a

4°C. El anticuerpo secundario para SMO fue un 488-Goat- α -rabbit (Servicio de Microscopía del CBMSO) a una dilución 1:500 en PBS, incubado durante 1 hora a 37°C. La tinción de los núcleos se hizo con Ioduro de Propidio (Servicio de Microscopía del CBMSO) a una dilución 1:100 en PBS durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS se montaron los cristales en portas con mowiol (Servicio de Microscopía del CBMSO). Se dejaron secar durante toda la noche en seco a temperatura ambiente y en oscuridad. Para la tinción de la β -actina se usó Faloidina-TRIC (Servicio de Microscopía del CBMSO) a una dilución 1:500 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente a la vez que se incubaba el anticuerpo secundario para SMO. Para la visualización y obtención de imágenes se usó el equipo Cámara ccd-monocroma y color Zeiss (Servicio de Microscopía y Confocal del CBMSO). El acabado y montaje de las imágenes se realizó con el programa Image J.

17. RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Los niveles de expresión de los diferentes genes se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real utilizando la tecnología *LightCycler* (Roche Diagnostics). Se utilizó el kit *LightCycler® RNA Master SYBR Green I* (Roche). Las condiciones fueron las siguientes: 20 minutos a 61°C para la transcripción inversa; 2 minutos a 95°C para la desnaturalización; 30 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a una T_m (específica de cada pareja de oligonucleótidos) y 15 segundos a 72°C para la amplificación; y finalmente, 30 segundos a 40°C. En nuestro caso, el diseño de los cebadores evita posibles contaminaciones de ADN, ya que el directo y el inverso se unen a exones distintos del gen en cuestión (Tablas 3 y 4). La cantidad relativa del gen de interés y de un gen que sirve como control interno de la calidad del ARN y de la amplificación (*housekeeping*), se determinó para cada muestra de forma integrada en cada experimento.

Gen	Especie		Secuencia en sentido 5'-3'	Tm
G6pdx	Ratón	Sentido	TAATGAGCTGGTCATCCGTG	55°C
	Ratón	Antisentido	CAGGCTTCCCTGAGTTCATC	55°C
Hmbs	Ratón	Sentido	ATACAGTGATGAAAGATGGGC	64°C
	Ratón	Antisentido	GGAATGTTACGGGCAGTGAT	64°C
Smo	Ratón	Sentido	TTGTGCTCATCACCTTCAGC	55°C
	Ratón	Antisentido	CCATCATGGGAGACAGTGTG	55°C
GliI	Ratón	Sentido	GCAGTGGGTAACATGAGTGTCT	64°C
	Ratón	Antisentido	AGGCACTAGAGTTGAGGAATTGT	64°C
Bcl2	Ratón	Sentido	GGTGGTGGAGGAAGTCTTCA	64°C
	Ratón	Antisentido	CAGATGCCGGTTCAGGTACT	64°C
Bcl6	Ratón	Sentido	ACCAAGCTCAGTGCCAGT	64°C
	Ratón	Antisentido	GCAGAAGAAGGTCCCAT	64°C
Bcl-XI	Ratón	Sentido	CCTTTTTCTCCTTTGGCGGG	64°C
	Ratón	Antisentido	TCTCGGCTGCTGCATTGTTC	64°C
Bid	Ratón	Sentido	CAACATCCAGCCCACACT	64°C
	Ratón	Antisentido	GGCCTTGTCGTTCTCCAT	64°C
Bax	Ratón	Sentido	AGAGGATGATTGCTGACG	64°C
	Ratón	Antisentido	GCCTTGAGCACCAGTTTG	64°C
CcdnI	Ratón	Sentido	TCTACACTGACAACTCTATCCG	64°C
	Ratón	Antisentido	TAGCAGGAGAGGAAGTTGTTGG	64°C
PtchI	Ratón	Sentido	GCATTCTGGCCCTAGCAATA	55°C
	Ratón	Antisentido	GTCTCAGGGTAGCTCTCATA	55°C

- Los oligonucleótidos de *Gli1*, *GLI1* y *Ptch1* se obtuvieron del siguiente artículo: [69]
- Los oligonucleótidos de *Bcl2* y *BCL2* se obtuvieron del siguiente artículo: [70]
- Los oligonucleótidos de *Ccdn1* se obtuvieron del siguiente artículo: [46]

Tabla 3: Características y denominación de cada uno de los oligonucleótidos utilizados en cada caso de ratón.

Gen	Especie		Secuencia en sentido 5'-3'	Tm
B2M	Humano	Sentido	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	55°C
	Humano	Antisentido	GATGCTGCTTACATGTCTCG	55°C
HMBS	Humano	Sentido	TCAGATAGCATACAAGAGACCA	60°C
	Humano	Antisentido	ATGTTTTTGGCTCCTTTGCT	60°C
SMO	Humano	Sentido	GTGAGTGGGATTTGTTTTGTGGG	60°C
	Humano	Antisentido	CGCAGCATGGTCTCGTTGAT	60°C
GLII	Humano	Sentido	GTTACATGCGCAGACACACT	60°C
	Humano	Antisentido	TTCGAGGCGTGAGTATGACTTC	60°C
BCL2	Humano	Sentido	TACCTGAACCGGCACCTG	60°C
	Humano	Antisentido	GCCGTACAGTTCCACAAAGG	60°C
CCDN1	Humano	Sentido	GAGGAACAGAAGTGCGAGGAGGA	60°C
	Humano	Antisentido	TGGAGTTGTCGGTGTAGATGCA	60°C
PTCHI	Humano	Sentido	CGGCAGCCGCGATAAG	60°C
	Humano	Antisentido	TTAATGATGCCATCTGCATCCA	60°C

- Los oligonucleótidos de *PTCH1* se obtuvieron del siguiente artículo:[52, 69]

TABLA 4: Características y denominación de cada uno de los oligonucleótidos usados en cada caso en humano.

18. Análisis de expresión y cuantificación de microRNAs

Para la realización de este ensayo se utilizó el método sugerido por el kit EXIQON que consiste en dos partes, una primera reacción de transcripción inversa universal mediante el kit *miRCURY LNA Universal RT microRNA PCR system (EXIQON)*, seguido de una reacción de amplificación por PCR a tiempo real mediante el kit *microRNA by quantitative real-time PCR using SYBR Green (EXIQON)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Para este último paso se encargaron parejas de oligonucleótidos específicos para cada miRNA, junto con 3 parejas de oligonucleótidos para 3 mensajeros que sirviesen como control en nuestro modelo de estudio, los cuáles eran U6 snRNA, hsa-miR-625* y hsa-miR-451. Las propias características de los miRNAs, donde la zona de máxima de complementariedad entre un miRNA y el mensajero problema se basa en 7 nucleótidos en el extremo 5' del miRNA ("seed sequence"), permite que se puedan usar oligonucleótidos diseñados para un miRNA humano también en ratón.

La reacción de transcripción inversa consiste en una incubación a 42°C durante 60min seguido de 95°C durante 5min en un termociclador (Gene Amp^R PCR System 9700). La reacción de amplificación por PCR a tiempo real consiste en los siguientes pasos (10min a 95°C, 10seg a 95°C, 1min a 60°C, 0seg a 95°C, 15seg a 65°C, 0seg a 95°C y 30seg a 40°C).

Para el análisis de la expresión relativa de cada miRNA se realizó con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ según se describe en el siguiente artículo[71].

19. Métodos estadísticos

Para comprobar que los grupos de datos se ajustaban a la normalidad, se empleó el test de Kolmogorov-Smirnov, y para comprobar la homogeneidad de las varianzas, se utilizó el test de Levene.

Las diferencias significativas en las comparaciones entre 2 datos de expresión fueron determinadas utilizando un test *t-Student* no pareado. Para comparaciones múltiples se aplicó un test *one-way* ANOVA, seguido de una comparación post-test Tukey.

Todos los test estadísticos se han llevado a cabo utilizando el software SPSS (SPSS Inc., version 14.0, Chicago, IL, USA).

La representación de los valores de significación en cada caso se ha representado de la siguiente manera:

Valor	Símbolo
$p \leq 0,05$	*
$p \leq 0,01$	†
$p \leq 0,001$	‡

20. Bases de datos

Específicas para Biología Molecular y Genética
www.ensembl.org
www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
www.genecards.org
www.ch.embnet.org/software/LALIGN
www.expasy.ch/tools/sim-prot
webcutter

Específicas para microRNA
www.mirbase.org
www.microna.org
www.miRGen
www.miRWalk
www.targetscan.org

RESULTADOS

1.- Sobre-expresión del gen *Smo* en Linfomas linfoblásticos T en ratón.

Como se había comentado en la introducción, nuestro equipo disponía de datos preliminares, derivados del estudio de *micromatrices* de expresión, que indicaban la sobre-expresión de *Smo* en linfomas linfoblásticos de ratón inducidos con radiación gamma (Bueno et al., *Blood* en prensa). Para confirmar o validar este dato, se han determinado los niveles de expresión de este gen en 25 ratones de la cepa C57BL/6J, de los cuales 11 sirvieron como control (no irradiados), y los 14 restantes correspondían a individuos que habían desarrollado el tumor durante el período de latencia tras el protocolo de irradiación. La determinación de los niveles de ARNm se realizó mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) usando la tecnología *LightCycler* (Roche Diagnostics) (FIGURA 18A), y mediante Western Blot (FIGURA 18B). El análisis comparativo entre los resultados de expresión obtenidos en las muestras de Timo control de ratón y las muestras de LinfomasLinfoblásticos T confirmó la sobre-expresión significativa del gen *Smo* en un 85% (12/14) de los tumores analizados.

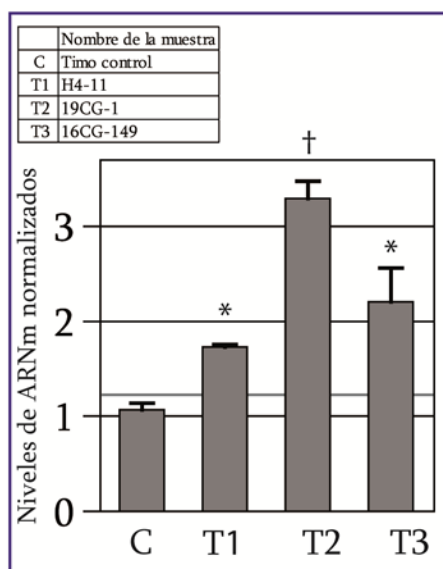


FIGURA 18A: Gráfica representativa de la sobre-expresión transcripcional normalizada de *Smo* en linfomas linfoblásticos T de ratones C57BL/6J inducidos con radiación gamma. Los datos representados son la media de tres experimentos independientes. Los niveles de significación entre las diferencias de expresión de la muestra control frente a las tumorales están representados en la gráfica. Como gen de referencia se usó *G6pd*. En el cuadro superior de la figura se especifica el nombre de la muestra usada en cada caso.

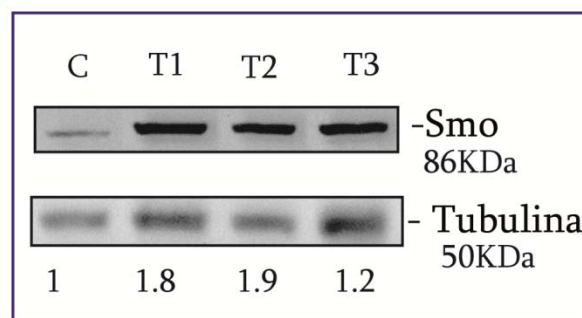


FIGURA 18B: Western Blot representativo, que indica la sobre- expresión de proteína de Smo, en linfomas linfoblásticos T de ratones C57BL/6J inducidos con radiación gamma. Donde se usó como proteína de referencia la expresión de Tubulina. La cuantificación normalizada de Smo frente a tubulina se muestra numéricamente debajo de cada banda. En el cuadro superior de la figura anterior se especifica el nombre de la muestra usada en cada caso.

2.- Análisis de sobre-expresión del gen *SMO* en muestras de Linfomas Linfoblásticos T en humano (T-LBL).

A continuación procedimos a comprobar si la sobre-expresión del gen *Smoothened* encontrada en nuestro modelo de Linfomas Linfoblásticos T de ratón se mantenía en muestras de Linfomas Linfoblásticos T humanos. Los análisis se realizaron en 21 tumores y 6 muestras de timo fetal control. Tras la extracción del ARN y las proteínas de los dos grupos de análisis, se llevó a cabo la comprobación de los niveles de expresión tanto del ARNm (por medio de la técnica *LightCycler (Roche Diagnostics)* (FIGURA 19A) como de la proteína (mediante Westen Blot) (FIGURA 19B). En un principio utilizamos como control muestras de timos fetales, pero tuvimos que descartar este planteamiento porque se observaron niveles muy heterogéneos de expresión entre muestras fetales, y niveles normalmente altos de expresión, probablemente debido a que la vía de señalización GLI/HH resulta clave durante estas etapas del desarrollo (datos no mostrados). Por tanto se optó por utilizar como control los timocitos de una línea inmortalizada con el virus saimiri de timocitos humanos, cuyo perfil citomérico recuerda de manera bastante aproximada el de un timo normal. Con este control, los resultados demostraban claramente la sobre-expresión de SMO en un 76% (16/21) de los tumores humanos analizados.

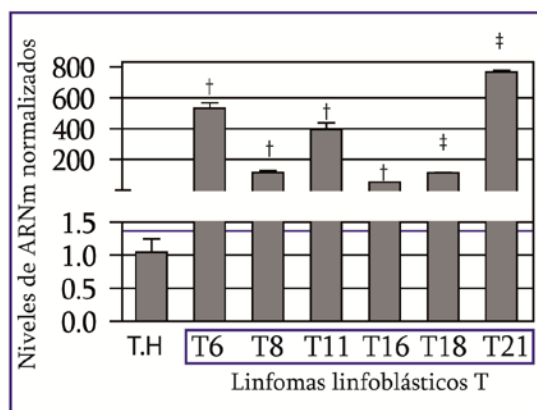


FIGURA 19A: Gráfica representativa de la expresión transcripcional normalizada de *SMO* en Linfomas Linfoblásticos T humanos. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de la muestra control frente a las tumorales están representados en la gráfica. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Las características de cada tumor analizado se encuentran en la TABLA 2 de Materiales y Métodos.

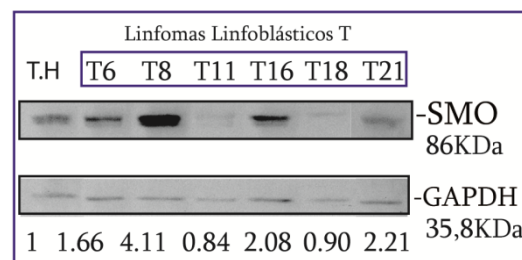


FIGURA 19B: Ensayo de Western Blot que confirma la sobre-expresión de la proteína *SMO* en Linfomas Linfoblásticos T humanos. Se usó como referencia la expresión de *GADPH*. La cuantificación normalizada de la expresión *SMO* frente a la de *GADPH* se muestra numéricamente debajo de cada banda. Las características de cada tumor analizado se encuentran en la TABLA 2 de Materiales y Método.

3.- Análisis de la expresión del gen *SMO* en líneas celulares derivadas de Linfomas Linfoblásticos T humanos y en líneas celulares derivadas de Linfomas T periféricos humanos.

Como ya describimos anteriormente las neoplasias de tipo *T* se pueden clasificar en dos categorías: los llamados *linfoma/leucemias linfoblásticas T de células precursoras* (T-LBLs y T-ALLs) (*generados por timocitos inmaduros*) y *linfomas T periféricos* (PTCLs) (*generado por linfocitos T ya maduros*). Para comprobar si la sobre-expresión del gen *SMO* era una característica diferencial de los linfomas/leucemias linfoblásticas T, se determinaron también los niveles de expresión de *SMO* en una colección de líneas derivadas de leucemias/linfomas linfoblásticos T y líneas derivadas de Linfomas T periféricos. Para ello se utilizaron tres líneas celulares humanas derivadas de linfomas linfoblásticos de células T que evidencian los diferentes estadios de maduración de los timocitos dentro del timo: *MOLT-4* ($CD3^+ CD4^+ CD8^+ TCR\ a/b^-$),

Peer (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ TCR a/b⁺) y *JURKAT* (SP CD4⁺ TCR a/b⁺) y la línea humana de timocitos inmortalizados con el virus saimiri (como control). Por otro lado, se utilizaron cinco líneas celulares humanas derivadas de linfomas T periféricos: HH, Hut78, SR786, MJ y Der17. El análisis de los niveles de expresión de *SMO* evidenció la sobre-expresión del gen *SMO* en las líneas derivadas de los linfomas linfoblásticos, y la baja expresión (o incluso ausencia de expresión) de *SMO* en el caso de las líneas celulares humanas derivadas de linfomas periféricos (FIGURA 20A,B Y C).

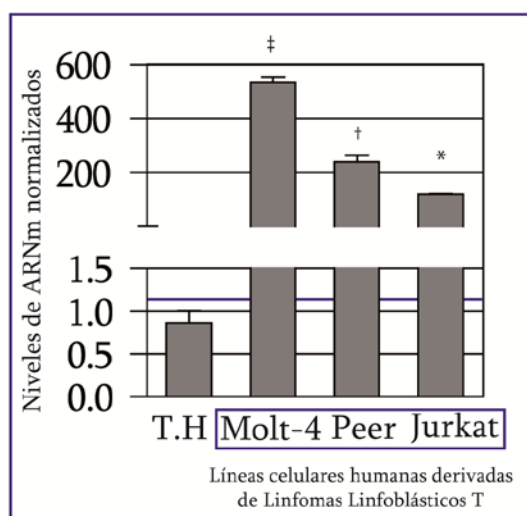


FIGURA 20A: Niveles de ARNm normalizados de *SMO* en líneas celulares humanas derivadas de linfomas/leucemias Linfoblásticos T. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de las líneas tumorales frente a la línea de timocitos humanos control están representados en la gráfica.

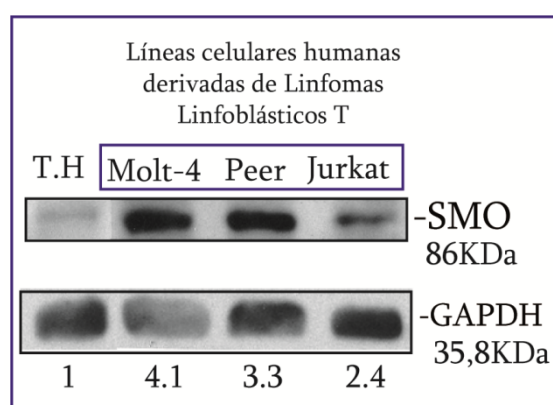


FIGURA 20B: Ensayo de Western Blot para determinar los niveles de expresión de la proteína *SMO* en líneas celulares humanas derivadas de linfomas/leucemias Linfoblásticos T. Se usó como referencia la expresión de GAPDH. La cuantificación densitométrica se muestra numéricamente debajo de cada banda.

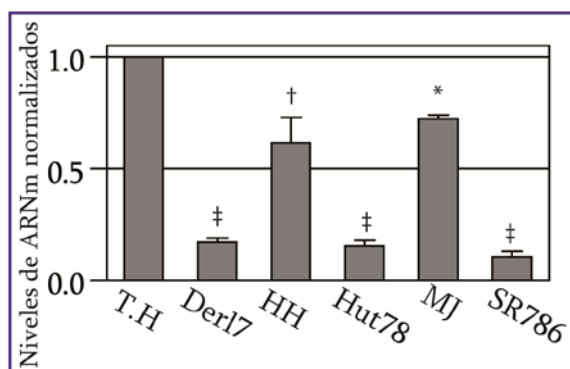


FIGURA 20C: Expresión transcripcional normalizada de *SMO* en líneas celulares humanas derivadas de linfomas de células T. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de las líneas tumorales frente a la línea de timocitos humanos control están representados en la gráfica.

4.- El gen *Smoothened* no experimenta mutaciones activantes en los linfomas linfoblásticos T.

Para comprobar si el gen *Smoothened* hubiera experimentado alguna mutación activante en los linfomas, lo primero que se abordó fue la secuenciación de *Smo* en cada una de las muestras de linfomas de ratón usados en los apartados anteriores. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar su secuencia codificante y clonarla en un plásmido *pcDNA3* (*Invitrogen*). Después se diseñó otra pareja de oligonucleótidos que reconocieran zonas intermedias de la secuencia de *Smo*, para así cubrir con ambas parejas la secuenciación del ADNc completo en las muestras control y tumorales (FIGURA 2 Materiales y métodos). Las secuencias resultantes se compararon con la secuencia de *Smo* publicada previamente (Genbank: NM_176996). No se encontró ningún cambio mutacional en ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados). Repetimos la misma operación para secuenciar el ADNc del gen ortólogo humano (*SMO*) en las muestras de linfomas linfoblásticos humanos (FIGURA 3 Materiales y métodos) y los resultados volvieron a ser negativos. En este caso la secuencia normal de referencia correspondía a la publicada previamente en Genbank con número de acceso NM_005631).

5.- La sobre-expresión del gen *Smoothened* supone la activación de la vía GLI/HH en líneas tumorales derivadas de Linfomas/leucemias Linfoblásticos T humanos.

Es un hecho conocido que la activación de *SMO* es capaz de inducir la activación de *MAP3K10* (MST) y la inactivación de *SUFU*, con la consiguiente estabilización y acumulación de los factores *GLI* en el núcleo. Por otro lado, la activación de la vía provoca el aumento en los niveles de transcripción de genes propios (como *PTCH1*, *CDON*, *BOC*, *GAS1*, y *GLI*), de genes relacionados con el ciclo celular (como *CCND1* y *CCND2*), o de genes determinantes del destino celular (como *FOXA2*, *FOXC2*, *SOX13*, *TBX2* etc) [40]. También se ha visto su implicación en la regulación de genes relacionados con la muerte celular (como *Fas*, *DR4*, *DR5*) y genes de supervivencia celular (como *BCL2* y *PDGFRα*, regulados transcripcionalmente por *Gli1* y *Gli2* respectivamente) [41]. Por tanto, el paso siguiente fue ver si había un aumento en los niveles de expresión de algunos de estos genes en las muestras de Linfomas Linfoblásticos T de ratón que tienen sobre-expresado el gen *Smo*. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de una asociación significativa entre la sobre-expresión de *Smo* y la sobre-expresión de *Gli1* en un 67% de los tumores sugiriendo, por tanto, que la vía de señalización GLI/Hedgehog podría estar activada en estos linfomas (FIGURA 21A).

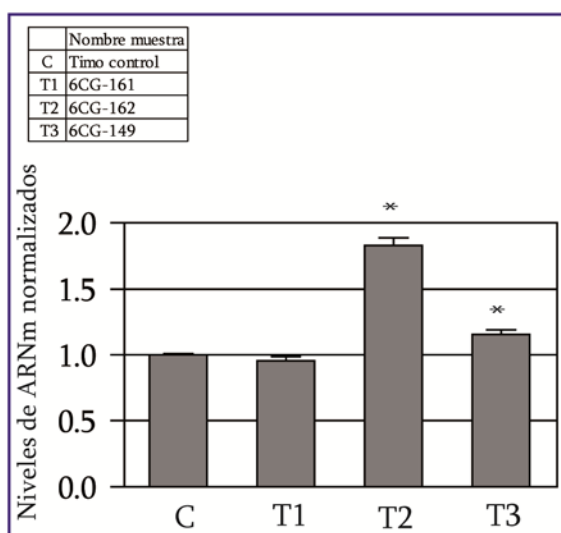


FIGURA 21A: Gráfica representativa de la expresión transcripcional normalizada de *Gli1* en linfomas linfoblásticos de ratón que sobre-expresan *Smo*. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de la muestra control frente a las tumorales están representados en la gráfica. Como gen de referencia se usó *G6pd*. En el cuadro superior de la figura se especifica el nombre de la muestra usada en cada caso.

A continuación quisimos comprobar si la sobre-expresión de *SMO* observada en las muestras de Linfomas Linfoblásticos T humanos era también capaz de provocar también una elevación en los niveles de expresión de *GLI1*. Como puede verse en la FIGURA 21B, la mayor parte de los linfomas que sobre-expresan *SMO* también mostraban sobre-expresión de *GLI1*.

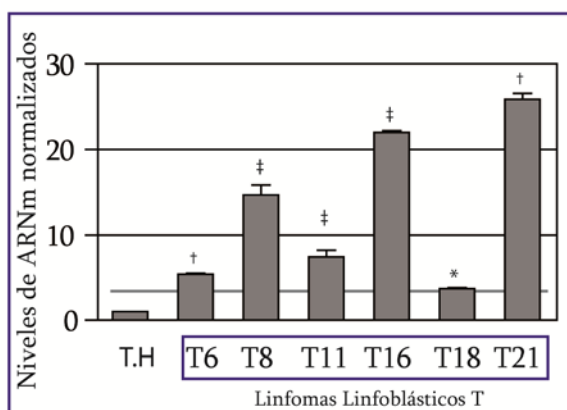


FIGURA 21B: Gráfica representativa de la expresión transcripcional normalizada de *GLI1* en linfomas linfoblásticos T humanos. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de la muestra control frente a las tumorales están representados en la gráfica. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Las características de cada tumor analizado se encuentran en la TABLA 2 de Materiales y Métodos.

Para comprobar que realmente existía una relación causal entre los niveles de expresión de *SMO* y los de *GLI1*, realizamos estudios adicionales analizando las consecuencias del bloqueo de la vía con KAAD-ciclopamina, un inhibidor específico de *SMO*. De esta manera confirmamos que al tratar durante 48h un cultivo de células JURKAT con KAAD-Ciclopamina a una concentración 10 μ M, los niveles de expresión de *GLI1* disminuían significativamente (FIGURA 21C).

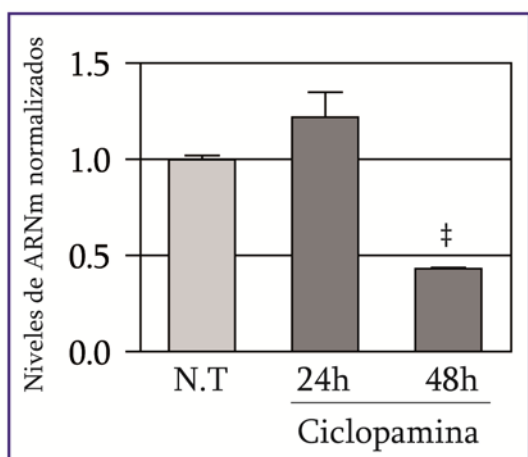


FIGURA 21C: Expresión transcripcional normalizada de *GLI1* en la línea tumoral JURKAT tras el tratamiento con ciclopamina durante 24 y 28 horas. Los datos representan la media de tres experimentos independientes repetidos por triplicado. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Los niveles de significación entre la diferencias de expresión de las células sin tratar y tratadas con el inhibidor están representados en la gráfica.

Finalmente, para comprobar si los cambios en la expresión de *SMO* estaban relacionados causalmente con la activación de la vía *GLI/Hedgehog* realizamos ensayos luciferasa en células JURKAT transfectadas con un vector portador de una construcción con sitios de reconocimiento para los tres factores de transcripción *GLI1*. La construcción *Gli-Luciferase-pGL2* está formada por ocho repeticiones de la región consenso 3' en el sitio de unión de proteínas *Gli* en la región *enhancer* del gen *HNF-3 β* , donde no sólo se ha comprobado la unión *in vitro* de los factores *Gli* de ratón sino también los de *GLI* humano. Si la sobre-expresión de *SMO* era capaz por sí sola de activar la vía, sería esperable detectar con claridad una bajada de la actividad luciferasa tras los tratamientos con KAAD-ciclopamina. Por tanto las células JURKAT transfectadas con esa construcción se trataron con diferentes concentraciones (2, 5 y 10 μ M) de con KAAD-Ciclopamina durante 24 y 48 horas (contadas desde la transfección). La concentración elegida fue finalmente la de 2 μ M, porque resultó ser la más eficiente en este ensayo y además suponía el menor riesgo de toxicidad. Los resultados demostraron claramente que el tratamiento con el antagonista de *SMO* provocaba una disminución de la señal luciferasa que era cada vez más acusada cuanto mayor fuese el tiempo de incubación con la droga. Es decir, la inhibición de *SMO* se traducía directamente en la inactivación de la vía (FIGURA 21D).

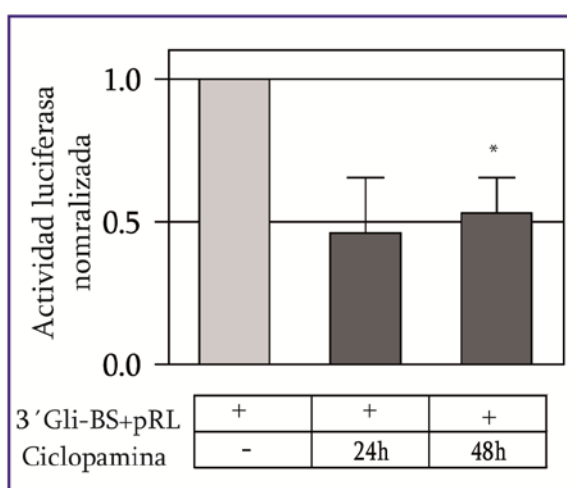


FIGURA 21D: Esquema representativo de los niveles de activación de la vía *GLI/Hh* mediante ensayos luciferasa con una construcción informadora, y la inhibición de *SMO* con ciclopamina. Se representan los valores normalizados de Renilla calculados mediante la razón valor luciferasa/valor renilla y se muestran las diferencias significativas de actividad luciferasa entre los dos puntos tratados con ciclopamina y la muestra de células transfectada igualmente con el vector luciferasa y sin tratar. El asterisco indica que las diferencias con respecto al control no tratado son significativas.

6.- La inactivación de SMO reduce la supervivencia celular e induce una reducción significativa de los niveles de muerte celular en líneas tumorales derivadas de Linfomas Linfoblásticos T humanos.

Como ya se ha descrito la activación de la vía puede provocar el aumento en los niveles de transcripción de genes controladores de la proliferación celular, como *CCND1* y *CCND2* [40] o de genes relacionados con la regulación de la muerte celular (como *Fas*, *DR4*, *DR5*) y la supervivencia celular (como *BCL2* y *PDGFRα*) [41]. Por tanto el objetivo siguiente fue determinar si se habían producido cambios en los niveles de expresión de algunos de estos genes en las muestras de Linfomas Linfoblásticos T de ratón usadas con anterioridad (FIGURA 22A). Los resultados obtenidos indicaban que el 77% de los tumores con sobre-expresión de *Smo* mostraban un aumento significativo en la expresión de *Ccdn1*, gen clave en la regulación del ciclo celular. Esta misma tendencia fue observada en linfomas humanos, donde la sobre-expresión del gen ortólogo *SMO* provoca un aumento de expresión del gen *CCDN1* en un 37% de las muestras humanas analizadas (FIGURA 22B).

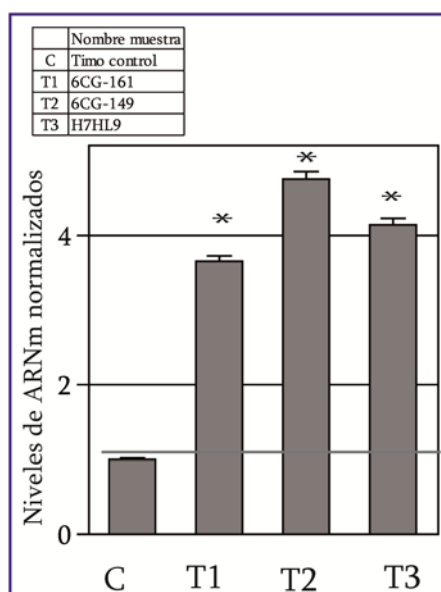


FIGURA 22A: Gráfica representativa de la expresión transcripcional normalizada de *Ccdn1* en linfomas linfoblásticos de ratón. Los datos representan la media de tres experimentos independientes repetidos por triplicado. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de la muestra control frente a las tumorales están representados en la gráfica. Como gen de referencia se usó *G6pd*. En el cuadro superior de la figura se especifica el nombre de la muestra usada en cada caso.

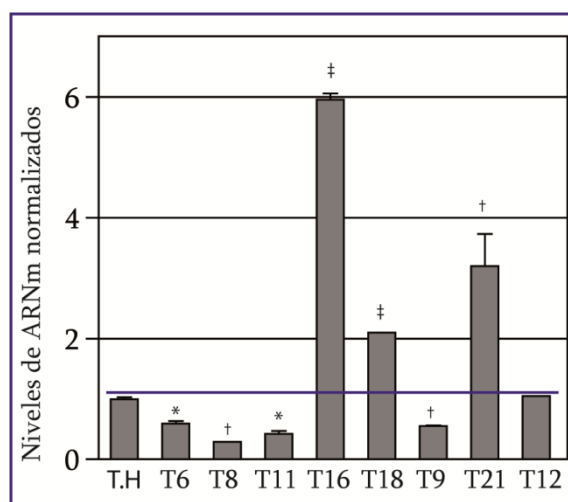


FIGURA 22B: Gráfica representativa de la expresión transcripcional normalizada de *CCDN1* en linfomas linfoblásticos T humanos. Los datos representan la media de tres experimentos independientes repetidos por triplicado. Los niveles de significación entre las diferencia de expresión de la muestra control frente a las tumorales están representados en la gráfica. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Las características de cada tumor analizado se encuentran en la TABLA 2 de Materiales y Métodos.

Una vez apuntado el posible efecto que la sobre-expresión de *Smoothened* en la proliferación celular en los Linfomas Linfoblásticos T, quisimos determinar experimentalmente el posible efecto de la inactivación de *SMO* en la viabilidad y proliferación celular en líneas celulares derivadas de Linfomas linfoblásticos T humanos. Para ello, se trató un cultivo de células JURKAT durante 24 y 48h con el antagonista de *SMO*, KAAD-ciclopamina, a una concentración de 10 μ M y después se determinaron los niveles de expresión de los genes *CCDN1* y *BCL2* mediante qRT-PCR. Los resultados demostraron que el bloqueo de *SMO* se traduce directamente en la disminución de los niveles de expresión del gen *CCDN1* (FIGURA 22C), lo que indicaría una probable disminución de la proliferación celular en dicho cultivo. Además, también se observa una disminución de los niveles de expresión de *BCL2* (FIGURA 22D), que podría interpretarse como causante de una disminución en la supervivencia o viabilidad de las células en dicho cultivo.

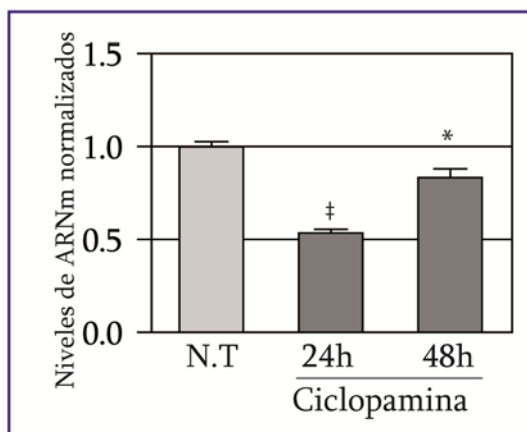


FIGURA 22C: Expresión transcripcional normalizada de *CCDN1* en la línea tumoral JURKAT tras su tratamiento con ciclopamina a una concentración de 10uM, durante 24 y 28 horas. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Los niveles de significación entre la diferencias de expresión de las células sin tratar y tratadas con el inhibidor se muestran en la gráfica.

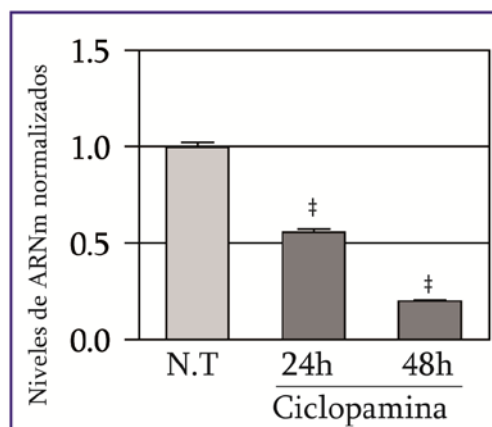


FIGURA 22D: Expresión transcripcional normalizada de *BCL2* en la línea tumoral JURKAT tras su tratamiento con el antagonista ciclopamina a una concentración de 10uM, durante 24 y 28 horas. Los datos representan la media de tres experimentos independientes. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*. Los niveles de significación entre la diferencias de expresión de las células sin tratar y tratadas con el inhibidor se muestran en la gráfica.

Para comprobar si la inhibición de SMO se podía relacionar causalmente con un cambio significativo en la viabilidad de las células JURKAT se trataron estas células con KAAD-Ciclopamina a una concentración de 10μM durante 5 días y se realizaron análisis diarios mediante citometría de flujo usando el reactivo 7AAD (FIGURA 22E). Los resultados demostraron que el mantenimiento del bloqueo de SMO se traducía en una disminución significativa de la viabilidad celular. Por el contrario, cuando el cultivo era tratado con DMSO (10μM), que se utilizó como control de referencia al ser el vehículo en el que se disuelve la KAAD-ciclopamina, o bien al ser tratado con Tomatidina (alcaloide no antagonista de SMO) no se observaba ningún cambio significativo en la viabilidad celular.

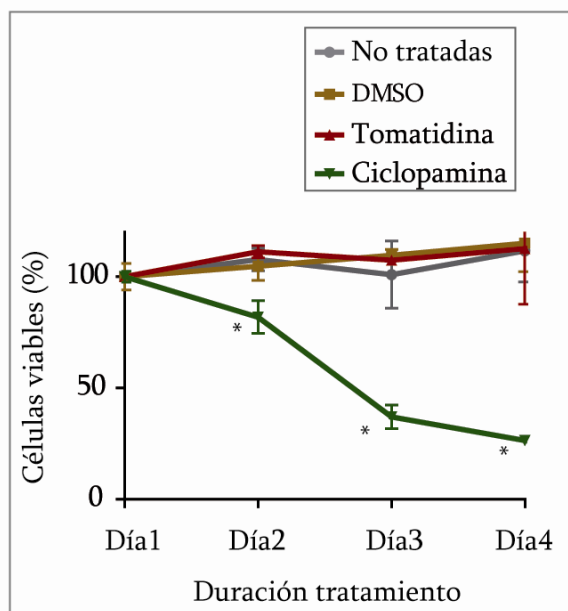


FIGURA 22E: Ensayo de viabilidad en células JURKAT mediante tratamiento con 7AAD y análisis citométrico.

El posible efecto del bloqueo de *SMO* sobre la proliferación celular se comprobó mediante el análisis por citometría de flujo de células JURKAT tratadas con ciclopamina y usando el reactivo CFSE. Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que existen diferencias significativas entre el grado de proliferación celular 24 y 48 horas después de la tinción con el reactivo fluorescente CFSE entre las células tratadas con ciclopamina y las células control. La proliferación de dicho cultivo se veía retenida o retrasada en comparación con las células JURKAT sin tratar o tratadas con DMSO o bien al ser tratado con Tomatidina (alcaloide no antagonista de *SMO*) (FIGURA 22F).

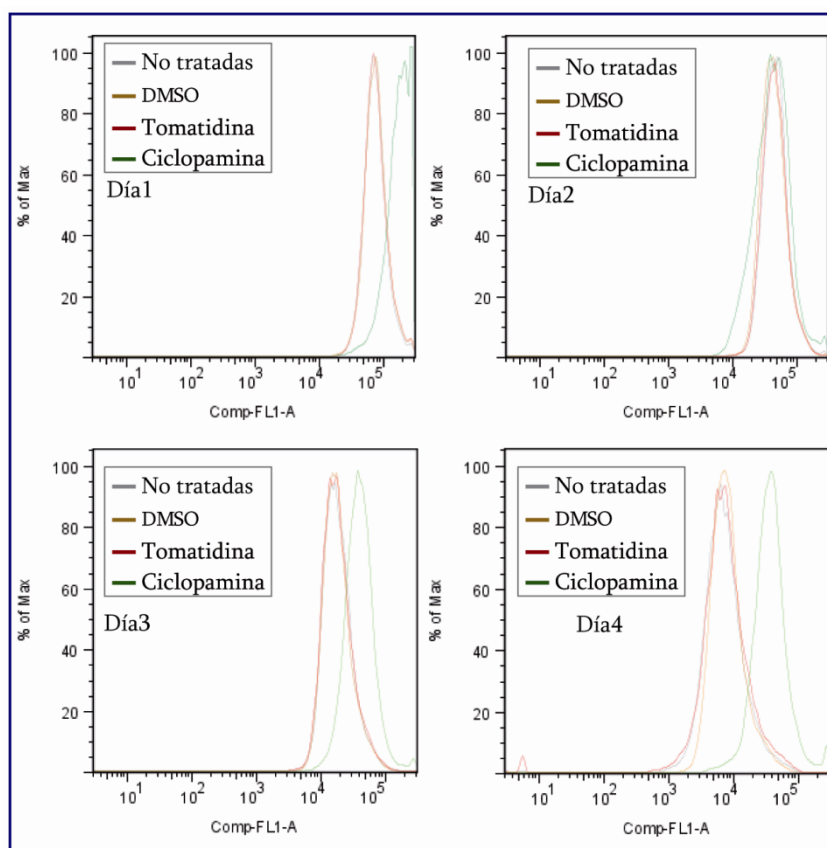


FIGURA 22F: Ensayo de proliferación en células Jurkat. Se realizaron tres experimentos independientes para estudiar la evolución del cultivo de células JURKAT no tratadas (NT), tratadas con ciclopamina 10 μ M (Cyc), tratadas con DMSO (10 μ M) y tratadas con Tomatidina (10 μ M). La pérdida de fluorescencia del reactivo CFSE sería proporcional al grado de proliferación de las células en cultivo.

Tras los resultados obtenidos quisimos comprobar el efecto del bloqueo en la vía de señalización GLI/Hh en cada una de las etapas del ciclo de división celular. Para ello tratamos un cultivo de células JURKAT con ciclopamina a diferentes concentraciones (2, 5 y 10 μ M) y analizamos la distribución de las células en las diferentes etapas del ciclo celular mediante tinción con IP (Ioduro de propidio) y citometría de flujo. Se encontraron diferencias significativas cuando los cultivos se trataron con ciclopamina 10 μ M durante 24 y 48 horas, observándose un aumento progresivo y significativo en el porcentaje de células que se encuentran en las fases de parada de ciclo celular G0/G1 y en la fase SubG1, que recogería el resultado de la muerte celular (FIGURA 22G).

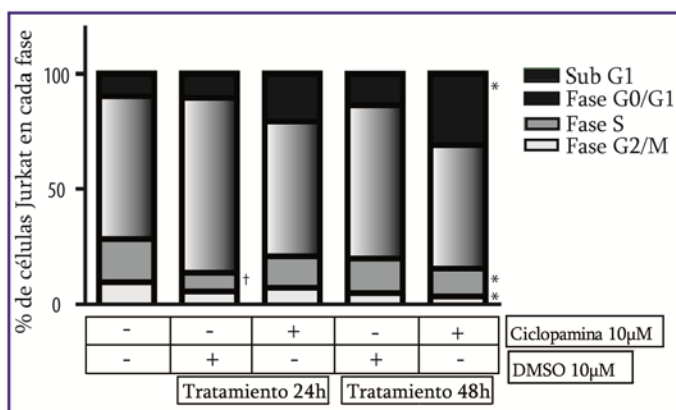


FIGURA 22G: Ensayo de ciclo celular en células JURKAT. Los datos representan la media de los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo de división celular, obtenida tras realizar tres experimentos independientes .

A raíz de este resultado decidimos comprobar el posible efecto anti-apoptótico de *SMO* mediante ensayos TUNEL, utilizando células JURKAT tratadas con KAAD-Ciclopamina, a concentraciones de 2, 5 y 10µM. Se observó comprobó un aumento significativo y progresivo en el porcentaje de células muertas por apoptosis cuando se utilizó la concentración 10µM de la droga (FIGURA 22H).

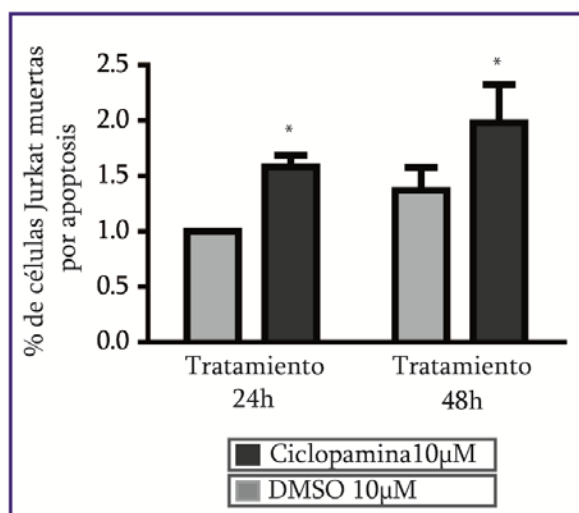


FIGURA 22H: Ensayo de TUNEL en células Jurkat. Se analizaron células JURKAT tratadas con ciclopamina 10µM, 24 y 48 h después del tratamiento.

El efecto anti-apoptótico de la sobre-expresión de *SMO* en líneas celulares tumorales derivadas de Linfomas Linfoblásticos T se confirmó también mediante Inmunohistoquímica, tras bloquear *SMO* en células JURKAT con un tratamiento de Ciclopamina 10µM durante 24h. Este ensayo permitió comprobar los niveles ya de por sí elevados de *SMO* en esta línea tumoral, que se ven saturados cuando el cultivo es

tratado durante 24h con *SHH*, el ligando de la vía, a 500 μ M. En estas condiciones se promueve además la agrupación de *SMO* en puntos concretos de la célula (FIGURA 22I). Por otra parte corroboramos datos ya publicados donde se habla precisamente de la correlación existente entre la localización en la superficie celular de *SMO* y la activación de la vía, sugiriéndose que la fosforilación y activación de *SMO* induce su acumulación en la superficie contribuyendo así a la activación de la vía *GLI/Hh*. En cambio la retención de *SMO* activado en vesículas endoplasmáticas supondría un bloqueo de la vía [72]3].

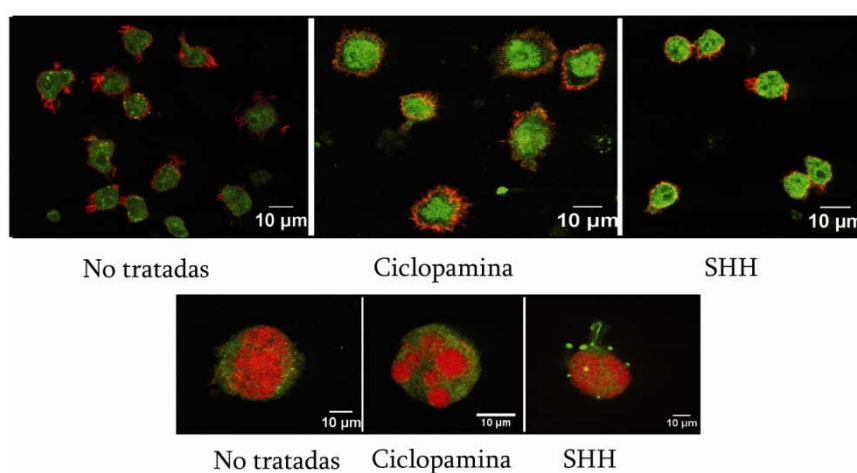


FIGURA 22I: Inmunohistoquímica en células Jurkat. Se analizaron tres puntos, células Jurkat sin tratar, tratadas con ciclopamina a 10 μ M y tratadas con SHH a 500 μ M. En la parte superior de la figura las células están incubadas con un anticuerpo secundario para SMO Alexafluor-488 (verde) y para la β -Actina con Faloidina-TRIC (rojo). Y en la parte inferior de la figura se aprecian sólo los núcleos de células Jurkat tratadas en las tres condiciones anteriormente mencionadas habiéndose usado un zoom 63X. En esta caso las células fueron incubadas con un anticuerpo secundario para SMO Alexafluor-488 (verde) y teñidos los núcleos con ioduro de propidio (rojo). Las células apoptóticas adoptan una configuración típica con núcleos fragmentados y citoesqueleto estallado.

7. Regulación de la expresión de *Smoothened* mediante miRNAs.

7.1.- Análisis en linfomas linfoblasticos T de ratón

El paso siguiente fue tratar de dilucidar el o los mecanismos mediante los cuales se producía la sobre-expresión del alelo normal (salvaje) de *Smoothened* en los linfomas, y la hipótesis de partida fue suponer que la expresión de este gen estuviese controlada por algún o algunos micro-ARNs y que esos micro-ARNs presentasen bajada de expresión en los linfomas. Para comprobar esta hipótesis realizamos una búsqueda “in silico” de los micro-ARNs candidatos a modular la expresión de *Smo* utilizando las bases de datos que se indican en material y métodos. Los resultados se recogen en la columna izquierda de la FIGURA 23A. Después acudimos a un *microarray* de expresión de miRNAs de linfomas linfoblásticos T de ratón inducidos con radiación gamma que nuestro equipo había realizado en colaboración con el Dr. Marcos Malumbres (CNIO) (GEO DATASETS, GSE10891 record: Gamma-irradiation induced T-cell lymphomas, miRNA study) (María J. Bueno et al., Combinatorial effects of micro-ARNs to suppress the Myc oncogenic pathway *Blood* 2011 *blood-2010-10-315432*; *published ahead of print April 8, 2011*, doi:10.1182/blood-2010-10-315432). En esta micromatriz se demostraba la bajada de expresión de 41 microRNAs, algunos de los cuales tenía como blanco teórico la región 3'UTR de *Smo* (columna central en FIGURA 23A).

miRNAs con diana en Smo	miRNAs con baja expresión en Linfomas Linfoblásticos T	miRNAs con diana en SMO
mmu-miR-470*	let-7a-2	hsa-miR-377*
mmu-miR-672	let-7e	hsa-miR-425
mmu-miR-425	miR-100	hsa-miR-338-3p
mmu-miR-127*	miR-10b	hsa-miR-658
mmu-miR-345-5p	miR-125b-1	hsa-miR-518f*
mmu-miR-30b*	miR-125b-2	hsa-miR-668
mmu-miR-18a*	miR-132	hsa-miR-874
mmu-miR-378*	miR-134	hsa-miR-30c-1*
mmu-miR-129-3p	miR-141	hsa-miR-452*
mmu-miR-335-3p	miR-145	hsa-miR-151-3p
mmu-miR-200a	miR-148a	hsa-miR-518c*
mmu-miR-141	miR-150	hsa-miR-505
mmu-miR-717	miR-154	hsa-miR-518d-5p
hsa-miR-573	miR-155	hsa-miR-193b
mmu-miR-489	miR-182	hsa-miR-324-5p
mmu-miR-345-3p	miR-187	hsa-miR-518e*
mmu-miR-485*	miR-193b	hsa-miR-142-3p
hsa-miR-640	miR-194-2	hsa-miR-621
mmu-miR-18a	miR-200a	hsa-miR-193a-3p
mmu-miR-615-5p	miR-200b	hsa-let-7e*
mmu-miR-30a	miR-200c	
mmu-miR-30c	miR-203	
mmu-miR-324-3p	miR-205	
mmu-miR-200c	miR-207	
mmu-miR-453	miR-217	
mmu-miR-323-5p	miR-22	
mmu-miR-200b	miR-221	
hsa-miR-639	miR-223	
mmu-miR-30d	miR-224	
mmu-miR-409-5p	miR-26a-1	
mmu-miR-542-5p	miR-26b	
mmu-miR-675-5p	miR-29b-2	
	miR-29c	
	miR-301a	
	miR-30a	
	miR-328	
	miR-345	
	miR-346	
	miR-375	
	miR-429	
	miR-99a	

FIGURA 23A: Comparación y búsqueda de miRNAs con bajadas en su expresión en Linfomas Linfoblásticos T de ratón y que tienen como blanco teórico la región 3'UTR de *Smo* y *SMO*.

A continuación seleccionamos cinco microRNAs con bajadas significativas de expresión en las micromatrices de microRNAs ($FDR < 0.0001$): tres de ellos con diana teórica en *Smo* (*mmu-miR-30a*, *mmu-miR-141*, y *let-7e*) y dos sin diana teórica en *Smo* que podrían ser utilizados como control negativo (*miR-193b* y *miR-203*) y llevamos a cabo la comprobación (o validación) de sus niveles de expresión, en las muestras de Linfomas Linfoblásticos T de ratón usadas en los apartados anteriores, mediante qRT-PCR con el kit EXIQON usando parejas de oligonucleótidos específicos para cada miRNA (FIGURA 23B). Los resultados mostraron una bajada significativa en los niveles de

expresión de mmu-miR-30a (60% de los tumores analizados), mmu-miR-141 (en el 90%), de mmu-miR-193b (80%), de mmu-Let-7e (60%) y por último de mmu-mir-203 (en el 90% de los tumores).

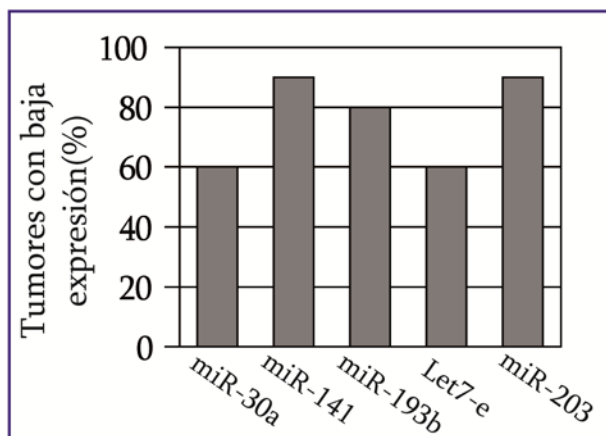


FIGURA 23B: Expresión transcripcional normalizada de los miRNAs miR-30a, miR-141, miR-19, Let-7e y miR-203 en muestras de timo de ratón C57BL/6J tratados con radiación gamma. Se representa en porcentaje de ratones que mostraban niveles de expresión significativamente bajos frente al valor de expresión obtenido en muestras de timo de ratones control. Como gen de referencia se usó *miR-451*.

Puesto que los mmu-miR-30a y mmu-miR-141 no sólo tenían niveles significativamente bajos de expresión en nuestros tumores de ratón sino que además tenían como diana teórica el 3'UTR de *Smo*, consideramos que su sub-regulación podrían estar contribuyendo a la sobre-expresión de *Smo* en los linfomas (FIGURA 23C).

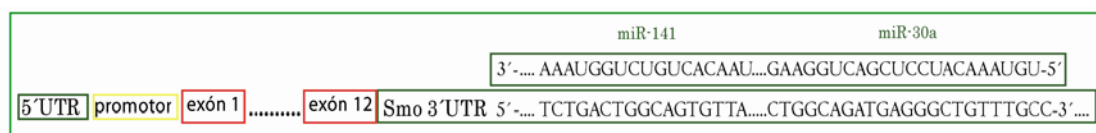


FIGURA 23C: Esquema representativo de las secuencias de reconocimiento de los miRNAs en la región 3'UTR de *Smo*.

Para confirmar el efecto modulador de estos dos microRNAs sobre la expresión de *Smo* el primer paso fue comprobar si los niveles de *Smo*, tanto de su ARNm como de su proteína disminuían significativamente en presencia de los miRNAs. Y, efectivamente, detectamos una bajada significativa en los niveles de expresión de *Smo* en células NIH-3T3 de ratón (células fibroblásticas embrionarias) cuando eran transfectadas con cualesquiera de esos dos microRNAs (FIGURA 23 D y E).

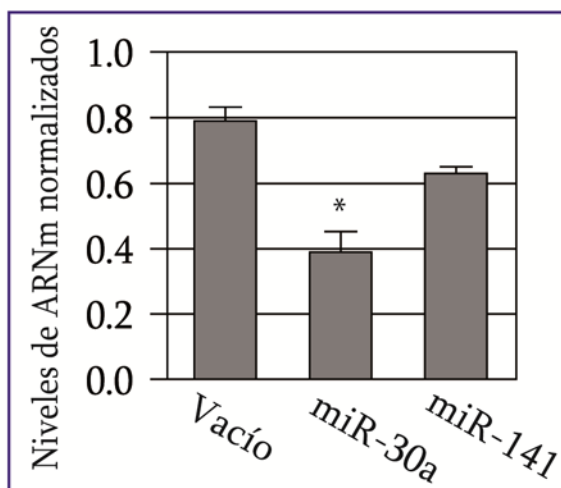


FIGURA 23D: Correlación entre la subida de expresión de los miRNAs, miR-30a y miR-141, con la bajada de expresión de *Smo* células de ratón NIH-3T3. En ambos casos se aprecia una bajada significativa de expresión del ARNm de *Smo* al comparar células transfectadas con el vector vacío (scramble-miRVec) con aquellas transfectadas con alguno de los miRNAs objeto de estudio. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*.

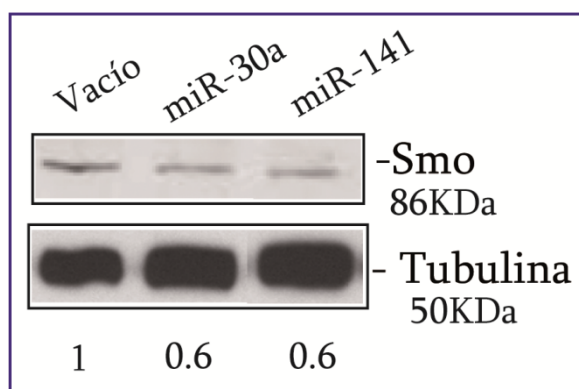


FIGURA 23E: Correlación entre la subida de expresión de los miRNAs, miR-30a y miR-141, con la bajada de expresión de *Smo* en células de ratón NIH-3T3. En ambos casos se aprecia una bajada significativa de expresión de la proteína de *Smo* al comparar células transfectadas con el vector vacío (scramble-miRVec) con aquellas transfectadas con alguno de los miRNAs objeto de estudio. Como proteína de referencia se usó la expresión de Tubulina. La cuantificación normalizada de *Smo* frente a tubulina se muestra numéricamente debajo de cada banda.

Para demostrar si la bajada de expresión de *Smo* se producía a través del reconocimiento de secuencias blanco específicas en la región 3'UTR del gen, llevamos a cabo un ensayo luciferasa *in vitro*, donde se co-transfectaron células NIH-3T3 con un vector luciferasa (que contenía la región 3'UTR de *Smo*), y un vector portador de miRNA (FIGURA 23F). De esta manera cuando el miRNA reconociera de manera efectiva a la región 3'UTR de *Smo*, la señal luminiscente tendría que disminuir por el consiguiente bloqueo en la transcripción y/o traducción del gen luciferasa.

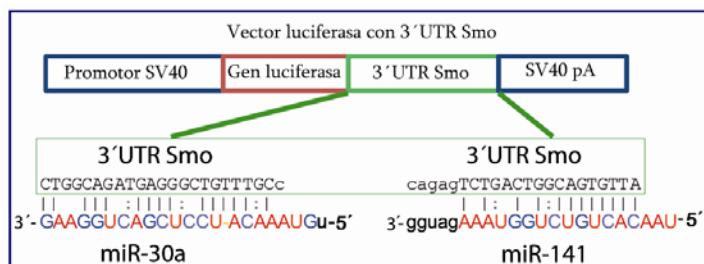


FIGURA 23F: Esquema representativo de la secuencia de interacción entre cada miRNA y la región 3'UTR de *Smo* que fue clonada en el vector luciferasa pGL3.

Los resultados demostraron claramente que la presencia de cualquiera de los dos microRNAs era capaz de reducir significativamente la señal bioluminiscente y, por tanto, se podría afirmar que el efecto modulador de los microRNAs sobre la expresión de *Smo* se producía, al menos en parte, a través de su interacción con la región 3'UTR (FIGURA 23G).

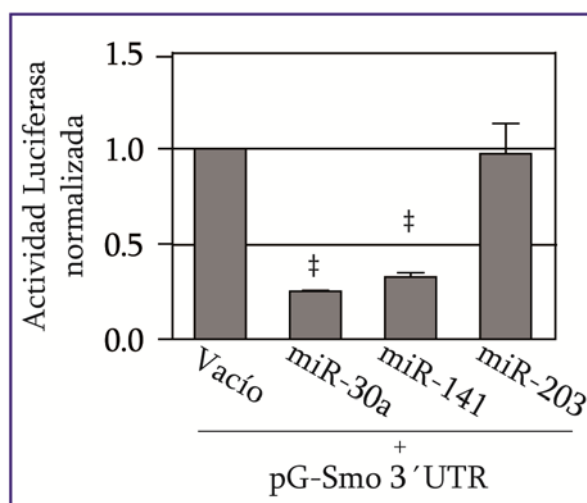


FIGURA 23G: Actividad luciferasa en construcciones que llevan clonado la región 3'UTR de *Smo* detrás de un gen luciferasa. Los valores representados de actividad luciferasa corresponden a la razón valor luciferasa/valor renilla en cada punto repetido 3 veces. Células NIH-3T3 fueron co-transfectadas con pG-*Smo* (construcción que lleva clonado la región 3'UTR de *Smo*) y un plásmido que exprese miR-30a, miR-141 o miR-203. La disminución en la actividad luciferasa se debe en exclusividad a la expresión de miR-30a o miR-141. La relación Luciferasa/miRNA es 1:1. Los niveles de significación están representados en la gráfica.

7.2.- Análisis con muestras humanas

Una vez demostrado el efecto de los micro-ARNs sobre la expresión del gen *Smo* en los linfomas de ratón, el paso siguiente fue comprobar si ocurría lo mismo en las muestras humanas. Siguiendo con el mismo esquema de trabajo primero se hizo un análisis *in silico* para identificar los micro-ARNs candidatos a regular el gen *SMO* humano, utilizando el mismo procedimiento que el descrito para el caso del ratón (FIGURA 24A). De esta forma identificamos 20 micro-ARNs que tendrían como diana teórica la región 3'UTR de *SMO*, y dos de ellos hsa-miR-193 y hsa-Let-7e aparecían también alterados en la micromatriz de miRNAs correspondiente a los linfomas de ratón (compárense las columnas central y derecha en la FIGURA 22A)

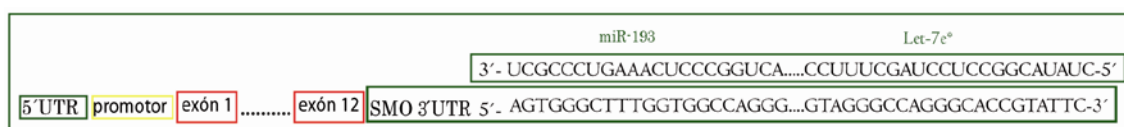


FIGURA 24A: Esquema representativo de la unión entre cada miRNA y la región 3'UTR de *SMO*

El paso siguiente fue comprobar si los niveles de expresión de ambos miRNAs bajaban significativamente en muestras humanas de Linfomas Linfoblásticos T. Los resultados obtenidos mediante un análisis de PCR a tiempo real con el kit EXIQON demostraron claramente la sub-regulación de ambos micro-ARNs, que disminuían su expresión en el 58% de los tumores (miR-193) y en un 80% en el caso de Let-7e (FIGURA 24B).

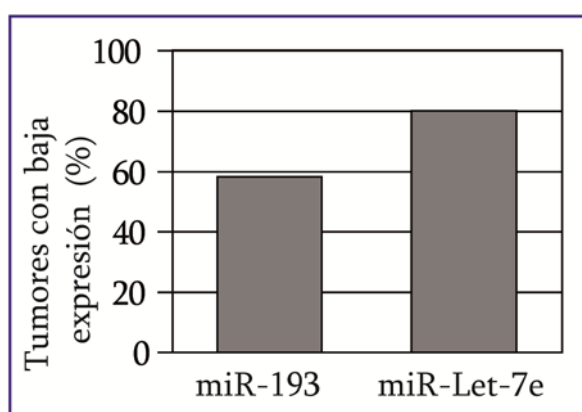


FIGURA 24B: Expresión transcripcional normalizada de los miRNAs miR-193 y Let-7e en muestras humanas de Linfomas Linfoblásticos T humanos. Se representa el porcentaje de Linfomas que mostraban niveles de expresión significativamente bajos frente al valor de expresión obtenido en muestras humanas control. Como gen de referencia se usó *U6 snRNA*.

Al mismo tiempo y teniendo en cuenta que en la mayoría de los ensayos habíamos usado la línea celular JURKAT (derivada de una Leucemia/Linfoma Linfoblástica T humana), analizamos también los niveles de expresión de ambos miRNAs en esta línea, utilizando como control una línea de timocitos humanos immortalizados con el virus saimirí. Como era esperable, se observó una reducción significativa en la expresión de ambos miRNAs (FIGURA 24C).

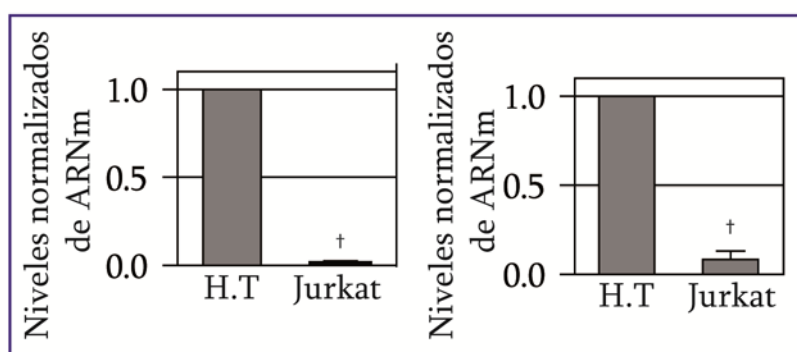


FIGURA 24C: Expresión transcripcional normalizada de los miRNAs miR-193 y Let-7e en una línea celular humana derivada de Linfomas Linfoblásticos T. Se representó la bajada de expresión significativa de los miRNAs miR-193 y Let-7e en células Jurkat frente a la expresión mostrada en la línea humana control de timocitos humanos immortalizados. Como gen de referencia se usó *U6 snRNA*.

Para validar los resultados obtenidos analizamos si los niveles de *SMO* en las células JURKAT (tanto los de su ARNm como los de su proteína) disminuían significativamente en presencia de alguno de estos dos miRNAs. Y efectivamente se observaron bajas significativas con ambos micro-ARNs, pero solo eran significativas en presencia de hsa-miR-193 (FIGURA 24D y E).

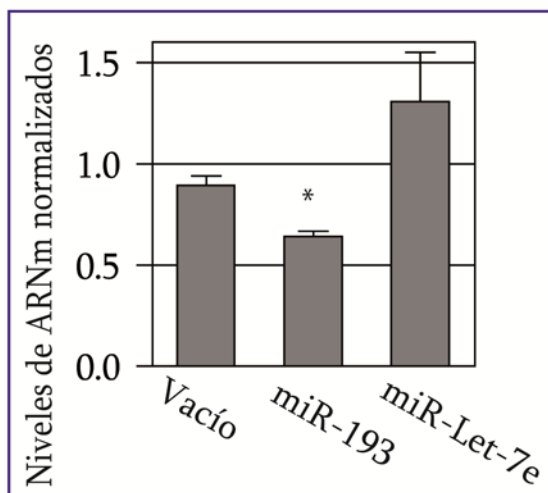


FIGURA 24D: Correlación entre la subida de expresión del miRNA, miR-193, con la bajada de expresión de *SMO* en células humanas Jurkat. Se aprecia una bajada significativa de expresión del ARNm de *SMO* al comparar células transfectadas con el vector vacío (scramble-miRVec) con aquellas transfectadas con miR-193. No ocurre esto en cambio al transfectar con Let-7e. Como gen de referencia se usó *B-2.microglobulina*.

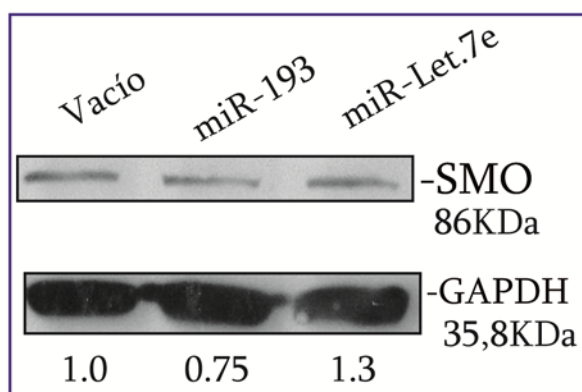


FIGURA 24E: Correlación entre la subida de expresión del miRNA, miR-193, con la bajada de expresión de *SMO* en células humanas Jurkat. Se aprecia una bajada significativa de expresión de la proteína de *SMO* al comparar células transfectadas con el vector vacío (scramble-miRVec) con aquellas transfectadas con miR-193. Como proteína de referencia se usó la expresión de GAPDH. La cuantificación normalizada de *SMO* frente a GAPDH se muestra numéricamente debajo de cada banda.

A continuación llevamos a cabo ensayos luciferasa co-transfectando células NIH-3T3 con un vector luciferasa (pSGG_3UTR, SwitchGear Genomics), que lleva clonado el 3'UTR de *SMO*, y vectores miRNA-vector (CNIO). El resultado de este ensayo nos permitió ver una bajada significativa de la señal luciferasa sólo cuando co-transfectábamos con el miRNA hsa-miR-193. Por lo tanto se podría pensar que el miRNA hsa-miR-193 controla la expresión de *SMO* a través de su interacción con secuencias blanco en la región 3'UTR de ese gen (FIGURA 24F).

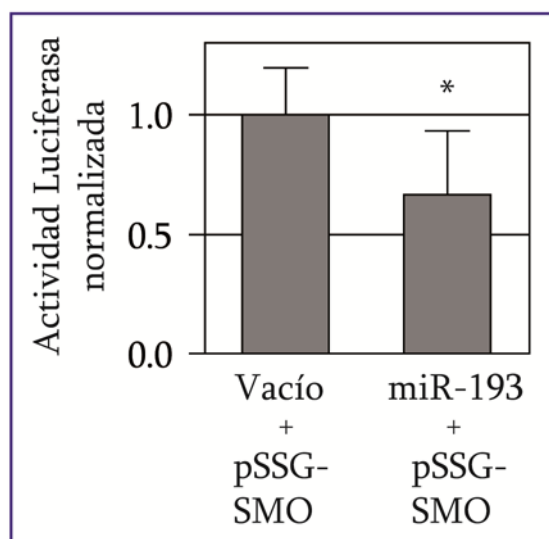


FIGURA 24F: Actividad luciferasa en construcciones que llevan clonado la región 3'UTR de *SMO* detrás de un gen luciferasa. Los valores representados de actividad luciferasa corresponden a la razón valor luciferasa/valor renilla en cada punto repetido 3 veces. Células NIH-3T3 fueron co-transfectadas con pSSG-*SMO* (construcción que lleva clonado la región 3'UTR de *SMO*) y un plásmido que exprese miR-193. La disminución en la actividad luciferasa se debe en exclusividad a la expresión de miR-193. La relación Luciferasa/miRNA es 1:1. Los niveles de significación están representados en la gráfica. Los niveles de significación están representados en la gráfica.

Como comprobación última de que hsa-miR-193 estaba actuando a través de su reconocimiento específico de una secuencia blanco en 3'UTR de *SMO*, observamos que la bajada en la señal bioluminiscente no ocurría cuando cambiábamos los nucleótidos específicos de la región de reconocimiento en 3'UTR de *SMO* mediante mutagénesis dirigida (FIGURA 24G).

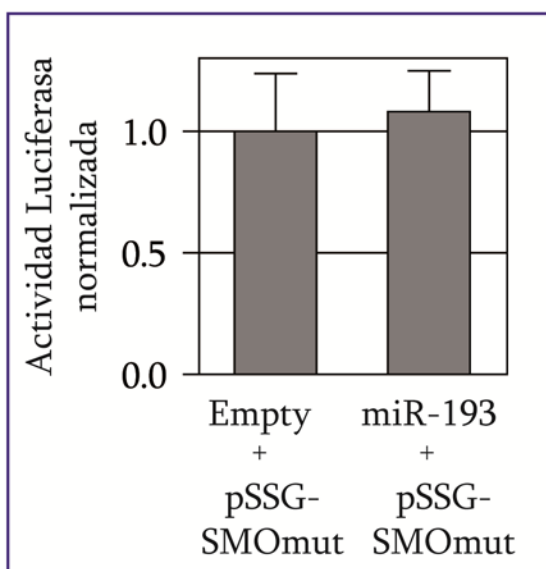


FIGURA 24G: Actividad luciferasa en construcciones que llevan clonado la región 3'UTR de *SMO* mutado detrás de un gen luciferasa. Los valores representados de actividad luciferasa corresponden a la razón valor luciferasa/valor renilla en cada punto repetido 3 veces. Células NIH-3T3 fueron co-transfectadas con pSSG-*SMO* mutado (construcción que lleva clonado la región 3'UTR de *SMO* mutado en 4 residuos específicos de la región diana para miR-193) y un plásmido que exprese miR-193. La actividad luciferasa se mantiene en ambos casos al no poder unirse el miR-193. La relación Luciferasa/miRNA es 1:1. Los niveles de significación están representados en la gráfica.

DISCUSIÓN

La vía de señalización GLI/Hedgehog está implicada en procesos tan esenciales como el desarrollo y la morfogénesis, la renovación de células madre de tejido, y la regeneración y reparación de tejidos [1, 2] Estos procesos implican la actuación de genes y la activación de vías de señalización que, cuando se alteran y muestran un funcionamiento anómalo, son a menudo protagonistas del desarrollo tumoral [1, 2] Por tanto, no resulta sorprendente que las alteraciones experimentadas por alguno de los componentes de la vía GLI/Hedgehog puedan traducirse también en la iniciación y/o crecimiento de diferentes tipos de tumores [3-5]. Este es el caso de las alteraciones descritas para el gen *PTCH1* cuya inactivación se ha descrito en cáncer de mama, o mutaciones en los genes *SMO* y *SUFU* en meduloblastoma y también mutaciones en el gen *GLI1* en cáncer pancreático [1, 2]

La activación de la vía de señalización GLI/Hh en los tumores ocurre normalmente mediante mutaciones inactivantes del gen *PTCH1* (*Patched*), aunque también se han descrito mutaciones activantes de *SMO* en el 10% de los Carcinomas de células basales (BCCs) [4, 6]. También se ha demostrado que la sobre-expresión de la mutación *Smo*^{W535L} observada en linfomas B es capaz de inducir linfomas altamente proliferativos, aunque estas células dependen del aporte de ligando por las células estromáticas de los órganos linfoides [7]. Los ratones transgénicos que sobre-expresan esa forma mutada de *Smo* pueden desarrollar meduloblastomas [8]. También se han descrito niveles anormales de expresión de *SHH* (el ligando Sonic Hedgehog de la vía), *PTCH1* (el receptor Patched) y *SMO* como eventos tempranos en el desarrollo de tumores de páncreas humanos [9]

Desde hace algunos años, nuestro equipo viene trabajando en la identificación de nuevas alteraciones genéticas o epigenéticas implicadas en los linfomas linfoblásticos T, partiendo de un modelo de ratón donde este tipo de linfomas se inducen con radiación gamma [10]. Hasta la fecha, habíamos encontrado evidencias de alteraciones en genes repartidos por siete de las ocho vías principales señaladas en el desarrollo del cáncer [11], pero ninguna alteración en algún componente de la vía GLI/Hedgehog. Sin embargo, en trabajos recientes de nuestro equipo realizados en colaboración con el Dr. Malumbres [11] habíamos encontrado evidencias preliminares de que *Smoothed*, el único elemento no redundante de la vía de GLI/Hedgehog, podría

mostrar un aumento anómalo de la expresión en los linfomas linfoblásticos T de ratón, en comparación con muestras sanas.

Por tanto, nos marcamos como objetivo central de esta tesis analizar si la sobre-expresión de *Smoothened* podría conducir por sí sola a la activación anómala de la vía de señalización GLI/Hedgehog en los linfomas, y determinar los mecanismos responsables de esa sobre-expresión. De este modo, describiríamos un mecanismo hasta la fecha no descrito para el desarrollo de linfomas linfoblásticos de células T, la activación desregulada de la vía de GLI/Hedgehog como consecuencia de la expresión anormalmente alta de *Smo* en las células del timo que dan lugar al tumor.

El papel de la vía GLI/Hh en la formación y maduración de las células T en el timo es clave. En concreto, la expresión del gen *Smoothened* resulta esencial durante los estadios más inmaduros de los timocitos ($CD4^-CD8^-CD44^+CD25^-$, Doble negativo1 y $CD4^-CD8^-CD44^+CD25^+$, Doble Negativo 2), durante los cuales la activación de la vía GLI/Hedgehog es necesaria para el desarrollo y la maduración de éstos. No obstante, incluso en los estadios de mayor maduración de los timocitos ($CD4^-CD8^+$, Simple positivo intermedio y $CD4^+CD8^+$, Doble positivo) es necesario mantener unos niveles basales de expresión de *Smo* [11].

Por tanto, parece razonable pensar que la activación constitutiva del gen *Smo* podría contribuir no sólo al origen de neoplasias malignas linfoblásticas de células T, sino también a su mantenimiento.

Los resultados que se presentan en esta tesis demuestran una expresión anormalmente elevada de *Smo*, tanto a nivel de ARNm como de proteína, en las muestras de linfoma linfoblástico de células T de ratón y de humano, así como en líneas celulares derivadas de estos. Este hecho apoya la idea de que la sobre-expresión del alelo normal (salvaje) de *Smoothened* puede contribuir al desarrollo de una buena fracción de linfomas linfoblásticos T, tanto humanos como inducidos en ratón, y que además podría ser un hecho diferenciador que permitiera distinguir este tipo de linfomas de los T periféricos.

Por otro lado, se ha descrito que la activación fisiológica de la vía de GLI/Hedgehog induce un aumento de expresión en genes relacionados con el ciclo celular como *CCND1*, con la supervivencia celular como *BCL2*, o incluso con la regulación de la

muerte celular programada o apoptosis como *FAS* [12-15]. Los resultados de esta tesis demuestran que la sobre-expresión de *Smoothened* en los linfomas linfoblásticos T y en líneas celulares derivadas de los mismos es capaz de activar la vía GLI/Hedgehog con independencia de ligando, y sugieren su contribución al aumento en la supervivencia celular, al aumento de la proliferación, así como a la inhibición de la apoptosis. Dado que hemos encontrado niveles de expresión anormalmente elevados de los genes *Gli1* y *Ccdn1* en el caso de linfomas linfoblásticos T de ratón, y *GLI1* y *CCDN1* en el caso de humanos, con respecto a situaciones control, podemos sugerir que el aumento de la supervivencia celular se podría explicar por la estimulación del gen *Bcl2*, la inducción de la proliferación podría explicarse por el aumento de expresión detectada en el gen de la *Ciclina D1 (CCND1)*, y la inhibición de la apoptosis podría atribuirse a la inhibición de *Fas*. Todo ello en conjunto conduciría a la alteración de los patrones de proliferación celular, supervivencia y muerte celular por apoptosis de las células T del timo, produciendo un crecimiento descontrolado de estas células, que contribuiría, al menos en parte, al desarrollo del tumor.

De cara a establecer una relación más directa entre los niveles elevados de expresión de *Smo* en los tumores y la alteración de las funciones celulares - proliferación, supervivencia, apoptosis - en los tumores, utilizamos un inhibidor específico de SMO que le mantiene en un estado conformacional inactivo, bloqueando su actividad, la Ciclopamina. Hemos comprobado que el bloqueo de la actividad de SMO con Ciclopamina tiene efectos inmediatos en las líneas celulares humanas derivadas de linfomas linfoblásticos T usadas para el estudio.

Por un lado, al tratar las líneas celulares humanas con el inhibidor de SMO, observamos que los niveles de expresión de los genes *GLI1*, *CCDN1* y *BCL2* - que en la situación tumoral se encontraban elevados- se mantienen inalterados o incluso bajan a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con la droga. (FIGURA 25)

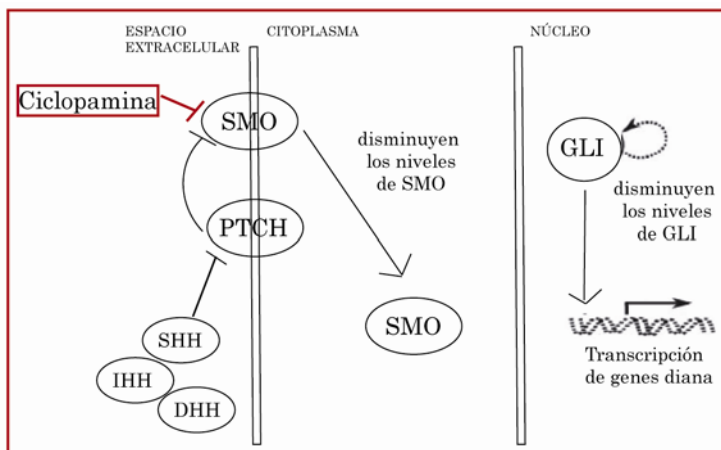


FIGURA 25:Esquema representativo del efecto que la ciclopamina tiene sobre SMO y por consiguiente en la vía de Hh. Dibujo adaptado a partir de [11].

Como consecuencia, en estas células disminuyen los niveles de proliferación celular, y se retrasa la división de éstas, respecto a la situación control. A la vez, el número de células viables para el mantenimiento de la población se reduce al bloquear la actividad de SMO, es decir, disminuye la viabilidad celular. Asimismo, hemos observado que en condiciones de bloqueo de SMO, se produce la parada del ciclo celular en las fases Sub-G1 y G0-G1, así como un aumento de los niveles de apoptosis a medida que aumenta el tiempo de tratamiento con la droga.

Por un lado, estos resultados sugieren una relación causa-efecto entre la sobreexpresión de *Smo* en los tumores y las funciones celulares alteradas que encontramos en los linfomas, y que podrían ser origen de los mismos.

Más aún, los resultados sugieren, por otro lado, que el tratamiento con Ciclopamina podría servir para controlar una situación tumoral de crecimiento y progresión celular descontrolados causados por la alteración de *SMO* en la vía Gli/Hh. Es decir, estaríamos frente a un posible tratamiento terapéutico de este tipo de tumores.

En otros tipos de cáncer, como en Glioblastoma, se ha usado la ciclopamina en humanos para disminuir el crecimiento tumoral, la renovación de células madre de glioma y la tumorigenicidad *in vivo* [16]. También se han desarrollado otros compuestos análogos a la ciclopamina y que están en fases pre-clínicas de estudio en

humanos por sus posibles efectos terapéuticos, pero se ha visto que el uso de alguno de ellos provoca el desarrollo de resistencias a la droga en el paciente, precisamente por mutaciones puntuales en *SMO* [17].

Finalmente, en esta tesis hemos tratado de identificar los mecanismos responsables de la sobre-expresión de *Smoothened* en los linfomas. Por un lado, las evidencias previas nos conducirían a buscar mutaciones activantes de *Smo*; sin embargo, el análisis comparativo de la secuencia codificante del gen en muestras normales y tumorales no evidenció cambio alguno en la secuencia de nucleótidos. Por otro lado, pensamos en otras formas posibles de alteración de la expresión del gen; inicialmente, analizamos la secuencia del promotor que regula a *Smo*, y encontramos que presenta una isla CpG grande (tanto en ratón como en humanos); así, especulamos con la posibilidad de que esta isla estuviese metilada en las muestras normales y se hubiera hipometilado anormalmente en los linfomas, con el consiguiente aumento de expresión del gen. Sin embargo, los análisis preliminares realizados en nuestro laboratorio mediante MSP (PCR específica de metilación) demostraron que la isla no estaba metilada en ninguna de las muestras (datos no mostrados). Finalmente, nos planteamos la posibilidad de que *Smo* sea un gen regulado por micro-ARNs. Como ya es sabido, los micro-ARNs actúan normalmente bloqueando la maduración y/o traducción de ARNm de genes diana concretos, de forma relativamente específica en el reconocimiento entre el micro-ARN y el gen regulado. Así, se ha descrito un mecanismo implicado en el desarrollo tumoral, por el cual algunos micro-ARNs que controlan la expresión de proto-oncogenes y genes supresores de tumores, sufren a su vez alteraciones en su expresión, que conducen a niveles de expresión anormales de sus genes diana.

Es un hecho probado que la sobre-expresión de muchos oncogenes se produce, al menos en parte, por este mecanismo [18, 19]. Es más, nuestro grupo había demostrado que la activación del oncogén *Ab/1* en linfomas linfoblásticos T inducidos con radiación gamma, e incluso la activación de su ortólogo humano (*ABL1*) y la del gen de fusión *BRCA-ABL* observada en otras neoplasias malignas, se debía a la sub-regulación de miR-203 [20].

Por otro lado, se han identificado varios micro-ARNs (miR-324-5p, miR-125b y miR-326) que se comportan como supresores de *Smoothened* y la vía de señalización

GLI/Hh, de tal manera que su inactivación contribuye a la formación de meduloblastomas [21].

Por todo esto, nos planteamos si en el desarrollo de linfomas linfoblásticos de células T se producen alteraciones en la expresión de micro-ARNs que controlen a *Smo*, que pudieran ser responsables de la alteración en los niveles de expresión de *Smo* en dichos tumores. (FIGURA 26)

Partiendo de una micromatriz de micro-ARNs de los linfomas de ratón, generada en colaboración con el Dr. Marcos Malumbres (CNIO) [20] comprobamos que, efectivamente, nuestro modelo de ratón para linfoma linfoblástico de tipo T inducido por radiación muestra patrones de expresión alterados de ciertos micro-ARNs. Por ello, para esta tesis seleccionamos aquellos micro-ARNs con expresión alterada en los linfomas, que tuviesen como diana teórica la región 3'UTR tanto del gen *Smo* como *SMO* (diana teórica calculada en base a la complementariedad entre el micro-ARN y la región 3'UTR del gen, a través de la denominada “seed sequence” del micro-ARN).

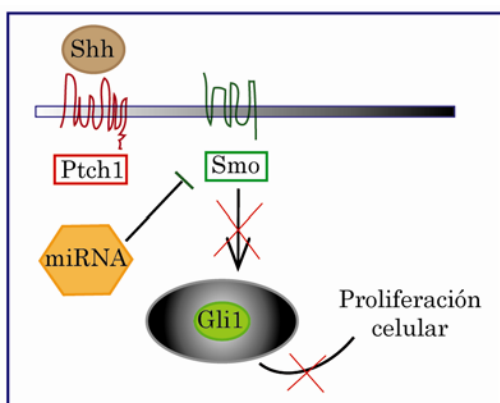


FIGURA 26: Esquema de actuación de un micro-ARN sobre el gen *Smo* y sus consecuencias sobre la población celular. Dibujo adaptado a partir de [11].

Los resultados obtenidos confirman que el aumento de expresión de *Smo* en muestras de linfomas linfoblásticos T de ratón, se debe al menos en parte a la bajada de expresión de los micro-ARNs mmu-miR-30a y mmu-miR-141, por su acción directa sobre la región 3'UTR de *Smo*, afectando no sólo a la traducción del mensajero sino también a su estabilidad.

Es más, en el caso de las muestras tumorales humanas, los resultados también sugieren que el aumento de expresión de *SMO* en las mismas, se podría deber, al menos en parte, a la bajada de expresión del micro-ARN hsa-miR-193, por su acción

directa sobre la región 3'UTR de *SMO*, afectando no sólo a la traducción del mensajero sino también a su estabilidad.

En conjunto, los resultados nos permiten sugerir que la sobre-expresión de *Smo* tanto en los linfomas de ratón, como en los linfomas humanos se podría explicar, al menos en parte, por la bajada de expresión de determinados micro-ARNs que regulan la expresión de estos genes.

Por tanto, proponemos que las alteraciones en la vía de señalización GLI/Hh, y más específicamente de *Smo*, podría ser clave en el desarrollo y/o en el mantenimiento de una buena fracción de linfomas linfoblásticos T, y sugerimos nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en el control de su actividad. Así, el tratamiento de los linfomas linfoblásticos T humanos podría pasar por controlar la actividad de *SMO* y su estabilidad transcripcional. Sería muy interesante hacer ensayos en modelos animales de linfoma, para poder pasar posteriormente a su ensayo en la clínica, en los que se pruebe el uso combinado de drogas alcaloides como la KAAD-Ciclopamina, capaz de bloquear la función de *SMO*, junto con la restauración de los niveles normales de expresión del miRNA-193, y por tanto de su función supresora de *SMO*. Proponemos que este tratamiento combinado podría tener un efecto terapéutico en pacientes con linfoma linfoblástico de células T, al controlar los niveles transcripcionales de *SMO* y su actividad proteica.

CONCLUSIONES

- 1- El gen *Smoothened* está sobre-expresado en una fracción significativa de linfomas linfoblásticos T inducidos en ratón con radiación gamma, en linfomas linfoblásticos T humanos y en líneas celulares derivados de este tipo de linfomas, pero no en líneas derivadas de linfomas T periféricos.
- 2- El análisis comparativo de la secuencia codificante del gen en muestras normales y tumorales no evidenció cambio alguno de nucleótidos en los linfomas.
- 3- La sobre-expresión del gen *Smoothened* supone la activación de la vía GLI/Hh, con la consiguiente sobre-expresión de *Gli1*, *Bcl2* y *Ciclina D1* y la inhibición de *Fas*, lo que se traduce en un aumento de la supervivencia y proliferación celular, y la inhibición de la apoptosis en las células tumorales.
- 4- La desregulación de la expresión del gen *Smoothened* está controlada por la sub-regulación de micro-ARNs en los linfomas.

Proponemos que la determinación del grado de activación de la vía GLI/Hh podría tener un valor diagnóstico para identificar una fracción importante de linfomas linfoblásticos T, y que el control de la misma constituiría una nueva estrategia terapéutica de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aarnio, M., et al., *Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes*. Int J Cancer, 1999. **81**(2): p. 214-8.
2. Santos, J., et al., *A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6680-3.
3. Goldgar, D.E., et al., *Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(21): p. 1600-8.
4. Hemminki, K., P. Vaittinen, and P. Kyyronen, *Age-specific familial risks in common cancers of the offspring*. Int J Cancer, 1998. **78**(2): p. 172-5.
5. Lichtenstein, P., et al., *Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland*. N Engl J Med, 2000. **343**(2): p. 78-85.
6. Feinberg, A.P., R. Ohlsson, and S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(1): p. 21-33.
7. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
8. Demant, P., *Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(9): p. 721-34.
9. Guerrero, I., et al., *Activation of a c-K-ras oncogene by somatic mutation in mouse lymphomas induced by gamma radiation*. Science, 1984. **225**(4667): p. 1159-62.
10. Santos, J., et al., *Genetically modified mouse models in cancer studies*. Clin Transl Oncol, 2008. **10**(12): p. 794-803.
11. de Leval, L., et al., *Molecular classification of T-cell lymphomas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **72**(2): p. 125-43.
12. Jaffe, E.S., et al., *Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4384-99.
13. Pui, C.H., et al., *Immunophenotypes and karyotypes of leukemic cells in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia*. J Clin Oncol, 1993. **11**(7): p. 1361-7.
14. Weiss, L.M., et al., *Clonal T-cell populations in lymphomatoid papulosis. Evidence of a lymphoproliferative origin for a clinically benign disease*. N Engl J Med, 1986. **315**(8): p. 475-9.
15. Engels, E.A., *Epidemiology of thymoma and associated malignancies*. J Thorac Oncol. **5**(10 Suppl 4): p. S260-5.
16. Crompton, T., S.V. Outram, and A.L. Hager-Theodorides, *Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 726-35.
17. Balmain, A., *Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models*. Cell, 2002. **108**(2): p. 145-52.
18. Santos, J., et al., *The stromal gene encoding the CD274 antigen as a genetic modifier controlling survival of mice with gamma-radiation-induced T-cell lymphoblastic lymphomas*. Oncogene. **29**(38): p. 5265-73.
19. Dragani, T.A., G. Manenti, and G. Della Porta, *Quantitative analysis of genetic susceptibility to liver and lung carcinogenesis in mice*. Cancer Res, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6299-303.
20. Malumbres, M., et al., *Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas*. Oncogene, 1997. **14**(11): p. 1361-70.
21. Malumbres, M., et al., *Hypermethylation of the cell cycle inhibitor p15INK4b 3'-untranslated region interferes with its transcriptional regulation in primary lymphomas*. Oncogene, 1999. **18**(2): p. 385-96.

22. Melendez, B., et al., *Characterization of the murine p19(ARF) promoter CpG island and its methylation pattern in primary lymphomas*. Carcinogenesis, 2000. **21**(4): p. 817-21.
23. Lopez-Nieva, P., J. Santos, and J. Fernandez-Piqueras, *Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaros in gamma-radiation-induced mouse thymic lymphomas*. Carcinogenesis, 2004. **25**(7): p. 1299-304.
24. De la Cueva, E., et al., *Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma*. Oncogene, 2006. **25**(29): p. 4128-32.
25. Perez de Castro, I.P., et al., *Cooperative alterations of Rb pathway regulators in mouse primary T cell lymphomas*. Carcinogenesis, 1999. **20**(9): p. 1675-82.
26. Bueno, M.J., et al., *Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression*. Cancer Cell, 2008. **13**(6): p. 496-506.
27. Villa-Morales, M., J. Santos, and J. Fernandez-Piqueras, *Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to gamma-radiation-induced thymic lymphoma*. Oncogene, 2006. **25**(14): p. 2022-9.
28. Villa-Morales, M., et al., *A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas*. Cancer Res, 2007. **67**(11): p. 5107-16.
29. Santos, J., et al., *Lack of correlation between DNA copy number and mRNA expression levels of c-myc in gamma-radiation-induced mouse thymic lymphomas by using quantitative real-time PCR*. Clin Transl Oncol, 2006. **8**(5): p. 349-53.
30. de Yzaguirre, M.M., et al., *Epigenetic silencing of E- and N-cadherins in the stroma of mouse thymic lymphomas*. Carcinogenesis, 2006. **27**(5): p. 1081-9.
31. Santos, J., et al., *Evidence of a possible epigenetic inactivation mechanism operating on a region of mouse chromosome 19 in gamma-radiation-induced thymic lymphomas*. Oncogene, 2001. **20**(17): p. 2186-9.
32. Lum, L. and P.A. Beachy, *The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers*. Science, 2004. **304**(5678): p. 1755-9.
33. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
34. Ruiz-Gomez, A., et al., *The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**(4): p. 901-12.
35. Teglund, S. and R. Toftgard, *Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma*. Biochim Biophys Acta. **1805**(2): p. 181-208.
36. Kavran, J.M., et al., *All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner*. J Biol Chem. **285**(32): p. 24584-90.
37. Huangfu, D. and K.V. Anderson, *Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates*. Development, 2006. **133**(1): p. 3-14.
38. Ruiz i Altaba, A., P. Sanchez, and N. Dahmane, *Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 361-72.
39. Chang, H., et al., *Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling*. Int J Biochem Cell Biol. **42**(9): p. 1462-71.
40. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA (review)*. Int J Mol Med, 2008. **22**(3): p. 271-5.
41. Mazumdar, T., et al., *Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells*. Cancer Res.
42. Rubin, L.L. and F.J. de Sauvage, *Targeting the Hedgehog pathway in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(12): p. 1026-33.
43. Sacedon, R., et al., *Expression of hedgehog proteins in the human thymus*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(11): p. 1557-66.
44. Lowrey, J.A., et al., *Sonic hedgehog promotes cell cycle progression in activated peripheral CD4(+) T lymphocytes*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1869-75.

45. Stewart, G.A., et al., *Sonic hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5451-7.
46. El Andaloussi, A., et al., *Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 418-26.
47. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog signaling pathway and gastric cancer*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(10): p. 1050-4.
48. Ohta, M., et al., *p53-Independent negative regulation of p21/cyclin-dependent kinase-interacting protein 1 by the sonic hedgehog-glioma-associated oncogene 1 pathway in gastric carcinoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10822-9.
49. Fukaya, M., et al., *Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer*. Gastroenterology, 2006. **131**(1): p. 14-29.
50. Karhadkar, S.S., et al., *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis*. Nature, 2004. **431**(7009): p. 707-12.
51. Sicklick, J.K., et al., *Hedgehog signaling maintains resident hepatic progenitors throughout life*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(5): p. G859-70.
52. Dierks, C., et al., *Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 944-51.
53. Reifemberger, J., et al., *Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1798-803.
54. Xie, J., et al., *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 90-2.
55. Lindemann, R.K., *Stroma-initiated hedgehog signaling takes center stage in B-cell lymphoma*. Cancer Res, 2008. **68**(4): p. 961-4.
56. Thayer, S.P., et al., *Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 851-6.
57. Peacock, C.D., et al., *Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4048-53.
58. Kalderon, D., *Hedgehog signaling: a smoothed conformational switch*. Curr Biol, 2008. **18**(2): p. R64-6.
59. Zhao, Y., C. Tong, and J. Jiang, *Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch*. Nature, 2007. **450**(7167): p. 252-8.
60. Friggi-Grelín, F., L. Lavenant-Staccini, and P. Therond, *Control of antagonistic components of the hedgehog signaling pathway by microRNAs in Drosophila*. Genetics, 2008. **179**(1): p. 429-39.
61. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
62. Bar, E.E., et al., *Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2524-33.
63. Mimeault, M., et al., *Cytotoxic effects induced by docetaxel, gefitinib, and cyclopamine on side population and nonside population cell fractions from human invasive prostate cancer cells*. Mol Cancer Ther. **9**(3): p. 617-30.
64. Singh, R.R., et al., *Sonic hedgehog signaling pathway is activated in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma*. Cancer Res, 2009. **69**(6): p. 2550-8.
65. Singh, R.R., et al., *Hedgehog signaling pathway is activated in diffuse large B-cell lymphoma and contributes to tumor cell survival and proliferation*. Leukemia. **24**(5): p. 1025-36.
66. Desch, P., et al., *Inhibition of GLI, but not Smoothed, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells*. Oncogene. **29**(35): p. 4885-95.
67. Varas, A., et al., *Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1476-83.

68. Athar, M., et al., *Inhibition of smoothened signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7545-52.
69. Yauch, R.L., et al., *A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer*. Nature, 2008. **455**(7211): p. 406-10.
70. Bar, E.E., et al., *Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bcl/II*. Am J Pathol, 2007. **170**(1): p. 347-55.
71. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
72. Jia, J., et al., *Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I*. Nature, 2004. **432**(7020): p. 1045-50.
73. Ingham, P.W. and M. Placzek, *Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(11): p. 841-50.
74. Reifengerger, J., et al., *Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas*. Br J Dermatol, 2005. **152**(1): p. 43-51.
75. Hallahan, A.R., et al., *The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7794-800.
76. Duman-Scheel, M., et al., *Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E*. Nature, 2002. **417**(6886): p. 299-304.
77. Han, M.E., et al., *Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(7): p. 3033-43.
78. Rudin, C.M., et al., *Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449*. N Engl J Med, 2009. **361**(12): p. 1173-8.
79. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
80. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
81. Ferretti, E., et al., *Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells*. Embo J, 2008. **27**(19): p. 2616-27.

AGRADECIMIENTOS

Me hace especial ilusión escribir esta parte de mi tesis doctoral, y es que uno no suele tener una oportunidad tan bonita como esta de dar las gracias. Tengo mucho que agradecer, y a mucha gente, que a lo largo de todos estos años han ido formando parte de mi vida. De cada persona, de cada experiencia, de cada momento,..., he aprendido algo, ya fuera para bien o para mal, y que en definitiva me han ido haciendo tal y como soy.

Quisiera empezar dando las gracias a mis padres, **Luis y Yeyi**, por ser como son. Por ser honrados, trabajadores, divertidos, locos, aventureros, buenas personas,..., por quererse y por querernos tanto a mis hermanos y a mí. Por confiar en cada uno de nosotros, luchar por nosotros y disfrutar de nosotros.

Darles las gracias por haberme dejado formar parte de todo lo que yo he querido. Primero por haberme apoyado y haberme dado la oportunidad de ser bailarina. A pesar de haber sido una época dura, desde los 7 hasta los 19 años, compaginando estudios y danza, fue una experiencia única. Aprovecho para dar las gracias a **África Guzmán**, por todo lo que aprendí dentro de su compañía de danza. Me enseñaron a bailar expresando e interpretando cientos de personajes, a vibrar y disfrutar con la danza, trabajar en grupo, observar, esforzarse al límite, viajar, conocer cientos de teatros,...; Siempre me alegraré de haber sido bailarina!

De nuevo darles las gracias a mis padres, por haber sabido ponerme un límite y haberme ayudado a buscar un futuro diferente a la danza, y de este modo haberme acercado al mundo de la ciencia; es decir, haberme puesto en contacto con **Manolo**, ...”ese sabio despistado”..., “mi colega” como él me dice. Gracias al **Dr. Manuel Martín Villa** por haberme abierto las puertas al mundo de la investigación.

Quisiera dar las gracias a mis 4 hermanos. Antes, hacer un inciso especial para mi mellizo **Jaime**, por protegerme, guiarme y escucharme desde la tripa de Mamá. ¡Seguro que ya ahí te atosigaba con mis millones de preocupaciones! Daros las gracias a los 4, a **Iñaki, Chete, Javi y Jaime**, sobre todo por quererme, por dejarme ser “uno” más del grupo. Por ser un ejemplo de inteligencia, simpatía, originalidad, cariño, esfuerzo,... Porque el tratar de ser como vosotros, siempre me ha hecho crecer. ¡En todo lo que hacéis se demuestra lo brillantes que sois!

Dar las gracias a mis 4 cuñadas, **Esther, Andrea, Cecilia y Reyes**, por hacerme un hueco, por entenderme, por cuidarme, por quererme, por escucharme, por formar parte de mi familia.

Gracias a **Marta y Cristina** por acompañarme desde el colegio, por dejarme compartir vuestra vida durante todos estos años, por conocerme, por mostrarme vuestro cariño, por ser mis amigas. Compartir miedos, juegos e ilusiones desde enanas.

Gracias a **Almu**, por aparecer en mi vida, quedarte, abrirme siempre puertas, guiarme y por seguir siendo una gran amiga. Por enseñarme un nuevo mundo en el que estarían todos ellos: **Mery, Ma, Cris, Pablo, Pata, Gel, Sonso, Nat y Laura**. Gracias a todos vosotros he vivido unos de los mejores años de mi vida. Gracias por todo lo que me habéis dado, lo que me habéis enseñado, lo que he disfrutado, lo que me he reído...; Gracias por vuestra amistad!

Por supuesto, gracias a **Isabela** por ser tú, por estar ahí, por tu sonrisa, por ser mi amiga.

Mery y Mario, gracias por acogirme, preocuparos por mí, aconsejarme.

Sonso y Alex, gracias por seguirme y entenderme.

Un agradecimiento que no puede faltar es hacia mis **tíos y primos**, gracias por ser mi familia. También a **Inés** por haber sido tan valiente de venirte a España y quedarte con nosotros.

Otra etapa de mi vida donde aprendí y disfruté mucho fueron los meses que estuve viviendo en Santiago de Chile. De aquí, he de agradecer al **Prof.R.Maccioni** la oportunidad que me brindó al dejarme trabajar en su laboratorio y por el interés que siempre mostró hacia mi trabajo.

Agradecer a mi tía **Toya** por todos los consejos y todo el cariño que me dio durante esos meses y que hoy continúa haciendo.

Como no, dar las gracias a **Teresa** por ser desde entonces una gran amiga, una gran persona que agradezco siempre tener cerca donde la positividad y la alegría “andan a sus anchas”. Y como no, a nuestro amigo **Connor**, por seguirme de Chile a España. Gracias por todas las aventuras que he vivido contigo y por enseñarme tu forma peculiar de entender la vida. Y gracias a **Juan** que desde entonces siempre que ha aparecido me ha demostrado que me conoce y que es un buen amigo.

Otra experiencia en el extranjero, de donde guardo buenos y malos recuerdos, fueron los meses que estuve viviendo en Miami, desde donde he de agradecer a la **Dra. Lidia Kos** la confianza y el interés que tuvo conmigo haciéndome un hueco en su laboratorio. Gracias a la **Dra. M. Lowenstein** por toda la ayuda que me diste. Por supuesto gracias a **Jaime** y **Alex** por hacerme reír, por vuestra compañía y apoyo.

Gracias a **Nacho** por todo lo que me has dado.

También quiero dar las gracias a todos mis **Compañeros de Bioquímica**. Aunque tuvimos que trabajar y estudiar duro, pasamos momentos muy divertidos y sobre todo, me motivasteis a introducirme en el mundo científico. Si alguien destaca durante esta época, sin duda alguna, esa es **Noe**, muchas gracias por todo.

Realmente mi primera experiencia científica relevante llegó gracias a la **Dra. Aurora Sánchez Pacheco**. Siempre te agradeceré lo bien que me has tratado, todo lo que me has enseñado, las oportunidades que siempre me has dado. ¡Gracias por haber sido mi tutora! Y también gracias a **Manu**, que durante ese tiempo fue un gran compañero de laboratorio.

Y si hay que destacar a compañeros de laboratorio, en ese caso hay que destacar a **Laura** e **Inma**, por haberme acogido tan bien y por haberme mostrado tanto cariño durante estos años de doctorado. Aunque nos conocemos menos, puesto que con ellas dos he compartido varios años, también quiero daros las gracias a **Chini**, **Ana María**, **Pilar**, **Lury**, **Angela** y **Manu**, por aguantarme durante estos últimos meses que he estado “agobiada perdida”.

Quisiera dar las gracias también al **Dr. Javier Santos** por aconsejarme y ayudarme.

Por supuesto dar las gracias a la gente del **Servicio de Microscopía, Genómica, Bioinformática y Citometría** (a **Silvia** y a **Berta**) y a todos mis **Compañeros del CBMSO**. En especial a **Kike**, **Alfonso** y **Ted**, porque siempre tenéis una risa, una muestra de cariño o de interés hacia mí.

Y dejo para el final el agradecimiento hacia las personas que más me han ayudado y enseñado durante mi doctorado. La **Dra. María Villa Morales**, que ha sido muy importante para mí, no sólo a nivel científico sino también a nivel personal. ¡Gracias **María** por abrirme las puertas hacia el apasionante mundo de la ciencia, de enseñarme la pasión que le pones a tus investigaciones, al trabajo, al esfuerzo,...; gracias por tu confianza y apoyo!

Y por último al **Prof. José Fernández Piqueras**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por dirigirme una tesis tan bonita como ésta, por valorarme y por apostar por mí.

¡Gracias de nuevo a **TODOS** por hacerme feliz y por formar parte de mi vida!

ANEXO

ORIGINAL ARTICLE

The stromal gene encoding the CD274 antigen as a genetic modifier controlling survival of mice with γ -radiation-induced T-cell lymphoblastic lymphomas

J Santos^{1,2,7}, L González-Sánchez^{1,2,7}, M Villa-Morales^{1,2}, I Ors^{1,2}, P López-Nieva³, C Vaquero^{1,2}, E González-Gugel^{1,2}, P Fernández-Navarro^{4,5}, AM Roncero¹, J-L Guenet⁶, X Montagutelli⁶ and J Fernández-Piqueras^{1,2}

¹Departamento de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ²Ciber en Enfermedades Raras, ISCIII, MICINN, Madrid, Spain; ³Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Catalonia, Spain; ⁴Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁵Ciber en Epidemiología y Salud Pública, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain and ⁶Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, Paris, France

Using an inter-specific subcongenic strain, Nested Recombinant Haplotype 3 (NRH3), generated between two mouse strains showing extreme differences in γ -radiation-induced thymic lymphoma susceptibility (SEG/Pas and C57BL/6J), we have identified a critical region on chromosome 19 that regulates survival of mice suffering from T-cell lymphoblastic lymphomas. Mapped on this region, the gene encoding the Cd274 ligand is able to trigger an inhibitory effect that modulates T-cell receptor (TCR) signalling and affects thymocyte maturation. Interestingly, this gene shows differential expression between thymic stromal cells from both strains in early response to a single sublethal γ -ray dose, but is inhibited in T-cell lymphoblastic lymphomas. Furthermore, we have identified several polymorphisms in the complementary DNA sequence of this gene that affect the affinity for its Cd279 receptor and are able to induce a differential rate of thymocyte apoptosis. Taken together, our data are consistent with *Cd274* acting as a genetic modifier that influences the survival of γ -radiation-induced T-cell lymphoma-bearing mice. The data similarly support the idea of a co-evolution of tumour cells and associated stromal cells to generate a favourable microenvironment for T-cell lymphoma growth.

Oncogene (2010) 29, 5265–5273; doi:10.1038/onc.2010.280; published online 19 July 2010

Keywords: T-cell lymphoblastic lymphoma; γ -irradiation; survival; thymus stroma; *Cd274* gene

Introduction

T-cell lymphoblastic lymphomas account for approximately 29% of non-Hodgkin's lymphomas in children (Sandlund *et al.*, 1996). They result from malignant thymocytes arising at defined stages of intra-thymic T-cell differentiation and often are clinically aggressive tumours showing great morphological variation. Despite the ever increasing understanding of the molecular pathogenesis and the improvements of treatment outcomes in patients during the past years, essential data about the genetic features remain to be elucidated (Aifantis *et al.*, 2008). The detection of genetic variants, in particular those with weak phenotypic effects in humans, remains difficult because cancer susceptibility does not, in general, segregate as single Mendelian traits. From such standpoint, working on mouse models has contributed decisively to the identification of tumour susceptibility genes (Balmain, 2002; Mao and Balmain, 2003).

In the past few years our group has focussed on the identification of new susceptibility genes, starting with a classical model of γ -radiation-induced thymic lymphoma (RITL) (Santos *et al.*, 2002). These lymphomas constitute a heterogeneous group of tumours, with most of them T-cell lymphoblastic lymphomas made up of immature thymocytes (Diamond *et al.*, 1988; Brathwaite *et al.*, 1992). Genetic loci involved in the susceptibility to RITL have been previously mapped at chromosomes 4, 5, 16 and 19 (Mori *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2001; Ochiai *et al.*, 2003; Kodama *et al.*, 2004; Villa-Morales *et al.*, 2007). Using inter-specific consomic and congenic mice between the RITL-resistant SEG/Pas (*Mus spretus*) and RITL-susceptible C57BL/6J strains, we identified a new region of approximately 14 Mb on mouse chromosome 19 that contributes to a significant reduction of the RITL incidence (*Tlyr1*) (Santos *et al.*, 2002). Recently, we have shown that the gene encoding the Annexin A1 protein (*Anxa1*), located at the proximal region of the *Tlyr1* region, may act as mediator in the control of

Correspondence: Professor J Fernández-Piqueras or J Santos, Departamento de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Nicolás Cabrera 1, 28049 Madrid, Spain. E-mail: jfpiqueras@cbm.uam.es

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 18 November 2009; revised 27 May 2010; accepted 28 May 2010; published online 19 July 2010

Modulation of the Fas-apoptosis-signalling pathway by functional polymorphisms at *Fas*, *FasL* and *Fadd* and their implication in T-cell lymphoblastic lymphoma susceptibility

María Villa-Morales^{1,2}, Elena González-Gugel¹,
Marta N.Shahbazi³, Javier Santos^{1,2} and
José Fernández-Piqueras^{1,2,*}

¹Área de Biología Celular e Inmunología, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera 1, 28049-Madrid, Spain, ²Ciber en Enfermedades Raras, Área de Inestabilidad Genética y Predisposición al Cáncer, Instituto de Salud Carlos III - Ministerio de Ciencia e Innovación, 46010-Valencia, Spain and ³Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Programa de Fundación BBVA-CNIO de Biología Celular del Cáncer, 28029-Madrid, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 91 1964627;
Fax: +34 91 196 44209;
Email: jfpiqueras@cbm.uam.es

In previous reports, we described germ line functional polymorphisms that differentiate *Fas* and *FasL* genes in two mouse strains (SEG/Pas and C57BL/6J) exhibiting extreme differences in susceptibility to γ radiation-induced T-cell lymphomas. Here, we provide new data reinforcing the importance of the extrinsic pathway of apoptosis mediated by Fas in T-cell lymphoma development and about the functional significance of polymorphisms located at intracellular and extracellular domains of *Fas* and *FasL*. Using DNA recombinant technology, we generate chimerical Fas and FasL proteins by combination of protein regions derived from the two strains and demonstrate that any Fas–FasL interaction involving chimerical proteins drive cell apoptosis to a significant lower extent than the wild-type SEG/Pas and C57BL/6J Fas–FasL systems. In addition, we report new polymorphisms in the coding sequence of *Fadd* and demonstrate that the interaction between Fas and Fadd is significantly stronger if Fas and Fadd are of SEG/Pas origin compared with the C57BL/6J system. Altogether, these results suggest a model in which functional polymorphisms at the three genes collaborate on the global ability of the Fas/FasL system to induce apoptosis. A complete analysis of these three genes in the pathway appears to be a *sine qua non* condition to accurately predict the effectiveness of the Fas system and to estimate susceptibility to T-cell lymphoma.

Introduction

Apoptosis in the immune system constitutes an essential process that regulates T-cell development within the thymus and peripheral homeostasis. Among the pathways involved is the Fas system, which has been reported to play a role in negative/positive selection of thymocytes during their development inside the thymus. The Fas system contributes as well to the elimination of peripheral lymphocytes after the clonal expansion phase and the autoreactive lymphocytes in the periphery, through the process called activation-induced cell death (1–9). However, the involvement of Fas-induced apoptosis in determining the genetic susceptibility to diseases affecting T cells is still under discussion (5,10,11).

We have previously reported that germ line functional polymorphisms at *Fas* and *FasL* genes may affect either their levels of expression and/or the biological activity of the Fas system in immature thymocytes, thus contributing to the susceptibility to develop γ

radiation-induced T-cell lymphoblastic lymphomas (12,13). A large number of nucleotide changes were found to spread all along the coding sequence of both *Fas* and *FasL*, some of them involving a change of amino acid between mouse strains extremely different in their susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphoma (C57BL/6J and SEG/Pas). Once demonstrated that the whole set of polymorphisms at *Fas* and *FasL* may modulate the genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas, the first goal of the present work was to separately assess the contribution of polymorphisms located at the extracellular or intracellular domains of both proteins. This objective was achieved using chimerical proteins generated by recombinant DNA technology.

In addition to Fas and FasL, Fadd is another essential element that should be taken into account to assess the global functionality of the Fas system. As a part of this system, Fadd is considered to be involved in the apoptosis of lymphocytes in peripheral lymphoid organs (14). However, the controversy about the implications of Fadd inside the thymus has been reopened in the recent years. Studies showing a critical role of Fadd inside the thymus (15) face those asserting that Fadd has a dispensable role in the development of thymocytes, although remaining essential for maintaining the homeostasis of peripheral T cells (16). This controversy prompted us to consider Fadd as the second goal in our study.

Materials and methods

Mice and treatments

C57BL/6J mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). SEG/Pas strain was provided by Drs J.L.Guenet and X.Montagutelli (Institute Pasteur, Paris, France). A cohort of mice was subjected to four sublethal doses of 1.75 Gy on a weekly basis, and the development of T-cell lymphoblastic lymphoma was followed during a 25 weeks latency period (13). Lymphomas were diagnosed as described previously (17). For animal experimentation, we followed the ethical considerations dictated by the European Commission (Directive 86/609/CEE) for the humane care and use of laboratory animals.

Chimerical Fas and FasL constructs

Fas-pcDNA3 and FasL-pcDNA3 constructs containing *Fas* and *FasL* complementary DNAs (cDNAs) from either C57BL/6J or SEG/Pas had been previously generated in our laboratory (13). Through digestion with XbaI (Fas-pcDNA3) or PstI and BamHI (FasL-pcDNA3) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), we released two fragments, one containing the sequence for the intracellular region and the other containing the sequence for the extracellular and transmembrane regions together with the plasmid. Cross-ligation of the fragments derived from C57BL/6J and SEG/Pas constructs allowed us to generate two new chimerical open reading frames combining the extracellular region of C57BL/6J with the intracellular of SEG/Pas and vice versa.

The functionality of the constructs was assayed through flow cytometry: we used phycoerythrin-conjugated hamster anti-mouse CD95 (clone Jo2) for Fas and biotin-conjugated mouse anti-mouse CD178.1 (clone KAY-10) for FasL together with phycoerythrin-conjugated streptavidin (all from BD Pharmingen, San Diego, CA). Primary antibodies were used in a 1:50 dilution, and secondary phycoerythrin–streptavidin was used in a 1:100 dilution. A FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) was used.

Cloning and sequencing of the mouse *Fadd* cDNA

Total RNA from testis of C57BL/6J and SEG/Pas mice was extracted using TriPure Reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Reverse transcription was done using SuperScript First-Strand Synthesis System for reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) followed by PCR using the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH). Conditions for PCR were as indicated by the manufacturer, with an annealing temperature of 55°C and an elongation

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; DD, death domain; DED, death effector domain; PCR, polymerase chain reaction; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

time of 45 s. The design of the primers was based on the previously reported sequence for *Fadd* cDNA from *Mus musculus* (Genbank accession no. NM_010175): *Fadd*-KpnI-Fw: 5'-GGTACCGATTTCCTATGTGGGATCGC-3' and *Fadd*-XhoI-Rv: 5'-CTCGAGTCCGGGTGTTTCTGAGGAAG-3' (restriction sites underlined).

Purified DNA fragments containing the *Fadd* cDNA were cloned into pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI). Fragments doubly digested with KpnI and XhoI (Roche Diagnostics GmbH) were subcloned into a pcDNA3 expression vector, which fused the FLAG epitope at the 3' end (pcDNA3-FLAG, kindly gifted by M.Quintanilla's team).

C57BL/6J and SEG/Pas-derived *Fadd* cDNAs were sequenced using an ABI Prism 310 Automated Sequencer (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). All comparisons between sequences were made using the program L-Align from ExPASy Molecular Biology Server.

Cloning of the *Fas* cDNA sequences

Using the above-mentioned *Fas*-pcDNA3 constructs from C57BL/6J or SEG/Pas as a template, we amplified the cDNAs of *Fas* to clone them into a pcDNA3 expression vector that fused the Haemagglutinin epitope at the 3' end (pcDNA3-HA, kindly gifted by M.Quintanilla's team). The primers included two distinct restriction sites for HindIII and NotI (underlined) and were as follows: *Fas*-HindIII-Fw: 5'-GCAAGCTTTTCCCTTGCTGCAGACATG-3' and *Fas*-NotI-Rv: 5'-GCGGCCGCTTTCCTCCAGACATTGTCCTT-3'.

PCR was performed using the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics GmbH) and the aforementioned primers. Conditions for PCR were as indicated by the manufacturer, with an annealing temperature of 60°C and an elongation time of 60 s. Purified DNA fragments containing the *Fas* cDNAs were doubly digested with HindIII and NotI (Roche Diagnostics GmbH) and cloned into pcDNA3-HA plasmid.

Cell cultures and transient transfections

Human HEK-293 cells were cultured as described elsewhere (18). Transfections were done using LipofectAMINE Reagent (Invitrogen).

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assays

Apoptosis was determined using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining (Roche Diagnostics GmbH) through microscopic observation. Glass-cultured HEK-293 cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde (Panreac Química S.A.U., Castellar del Valles, Spain.), permeabilized in 0.1% Triton X-100 sodium citrate and then stained with TUNEL following the manufacturer's guidelines. Deoxyuridine triphosphate labelling of DNA strand breaks was visualized on a Zeiss Axiovert200 fluorescence microscope.

Caspases activation

For immunodetection of caspase-3 and caspase-8, 40 µg aliquots of total cell lysates obtained with radioimmunoprecipitation assay cell lysis buffer were separated by 15% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions and electrotransferred to pure nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Rabbit anti-mouse polyclonal antibody H-277 against caspase-3 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and mouse monoclonal antibody 1C12 against caspase-8 (1:500) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) were, respectively, used with appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase. Subsequently, the peroxidase activity was obtained using Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Monoclonal anti-α-tubulin clone DM 1A antibody (1:10 000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was used for loading control. Quantification of bands was made through densitometry using the Scion Image program.

Co-immunoprecipitation experiments

HEK-293 cells were transiently transfected with the pcDNA3-Fas-HA and pcDNA3-Fadd-FLAG constructs. Cells were lysed 24 h after transfection and protein expression was determined by western blotting or co-immunoprecipitation. For immunoprecipitation experiments, cells were lysed in IPH buffer [0.5% NP40 (IGEPAL), 150 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid and 50 mM Tris-HCl; pH 8] and a cocktail of protease inhibitors: 2 mM Phenylmethylsulphonyl fluoride, 2.5 µl/ml Protease Inhibitor Cocktail and 10 µl/ml Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Roche Diagnostics GmbH). Tagged *Fas* and *Fadd* proteins were immunoprecipitated using 1 µg of monoclonal antibody anti-HA (clone 3F10; Roche Diagnostics GmbH) or anti-FLAG (Sigma-Aldrich). Rabbit anti-rat or anti-mouse IgGs (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) coupled to protein A-Sepharose (Sigma-Aldrich) were used as secondary antibodies. Detection of co-precipitated proteins in western blots under non-reducing conditions was performed with anti-HA (1:500) and anti-FLAG (1:1500) monoclonal antibodies and appropriate secondary antibodies: Immunopure Goat Anti-Rat IgG, (H+L), Peroxidase Conjugated (1:5000) (Thermo Scientific, Pierce

Biotechnology, Rockford, IL); ECL Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab (from sheep) NXA931 (1:1000) (GE Healthcare). A monoclonal sheep anti-mouse antibody for β-actin (GE Healthcare) was used in a 1:5000 dilution for loading control.

When specified, co-immunoprecipitation assays were carried out after *in vitro* FasL-induced activation of *Fas* system: 24 h after transfection, around 6×10^6 HEK-293 cells co-transfected with pcDNA3-Fas-HA and pcDNA3-Fadd-FLAG were co-cultured in P100 culture plates with a similar number of cells transfected with C57BL/6J or SEG/Pas-FasL-pcDNA3. Lysis using IPH buffer was carried out 8 h after plating.

Statistical methods

Statistical significances were determined using a one-way analysis of variance with a Tukey post-test, when multiple comparisons were performed or with a T-Student test in the case of two-group comparisons. All statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (version 15.0; SPSS, IBM Corporation, Somers, NY).

Results

Functionality of the intracellular and extracellular polymorphic regions of *Fas* and *FasL*

In an attempt to elucidate the functional significance of polymorphisms located at the intracellular and extracellular regions of *Fas* and *FasL*, we separately assayed the effect of these polymorphic domains through the construction of chimerical *Fas* and *FasL* proteins combining the intracellular and extracellular regions from C57BL/6J and SEG/Pas mouse strains (Figure 1). Using co-cultures of human HEK-293 cells transfected with the chimerical receptors with cells transfected with the chimerical ligands, the *in vitro* levels of induced apoptosis were investigated in all the possible combinations. We chose HEK-293 as the recipient cells because they express a much reduced amount of *FAS* and *FASLG* compared with the exogenous expressions after transfections (data not shown).

The global effect on cell apoptosis was determined through TUNEL assay (Figure 2a). The non-chimerical systems (first four bars on the left) were used as reference. Interestingly, any *Fas*-*FasL* interaction involving chimerical proteins drive cell apoptosis to a significant lower extent than the non-chimerical SEG/Pas and C57BL/6J *Fas*-*FasL* systems. Using the SEG/Pas system (second bar) as the control reference for maximal apoptosis (see also ref. 13), our results showed that there exist significant reductions in the levels of induced apoptosis in any combination bearing at least one chimerical protein (*Fas* and/or *FasL*). However, not all the combinations exhibit the same level of reduction compared with the SEG/Pas system; we can distinguish two statistically different groups. On the one hand, a group exhibits apoptotic levels that fluctuate between 0.30 and 0.50 in comparison with the SEG/Pas system. This implies a reduction in the levels of *Fas*-induced apoptosis of between 50% and 70%. This group is constituted by the chimerical combinations BS-S, SB-B, SB-S, B-BS, S-BS, B-SB and S-SB. The second group exhibiting the maximal reduction (between 73 and 85%, apoptotic levels between 0.15 and 0.27) is formed by the four doubly chimerical combinations, together with the BS-B combination. These results clearly indicate that it is the accumulation of polymorphic amino acid along the *Fas* and *FasL* proteins what determines the different level of apoptosis observed between SEG/Pas and C57BL/6J. However, when only the intracellular region of *Fas* in the BS-B combination was substituted, a marked reduction in the level of apoptosis was also induced. Thus, it seems reasonable to think that the polymorphic amino acids located at this region may be of major importance in this process.

This generalized reduction in the levels of apoptosis detected by TUNEL assays was corroborated by measuring the levels of active caspase-8 and caspase-3. All chimerical combinations showed a reduction in the amount of active caspase-8 and caspase-3 when compared with the non-chimerical SEG/Pas system (Figure 2b).

To rule out the possibility that chimerical *Fas* and *FasL* proteins exhibit impaired expression or stability, which might account for the reduced apoptosis levels as compared with the wild-type systems,

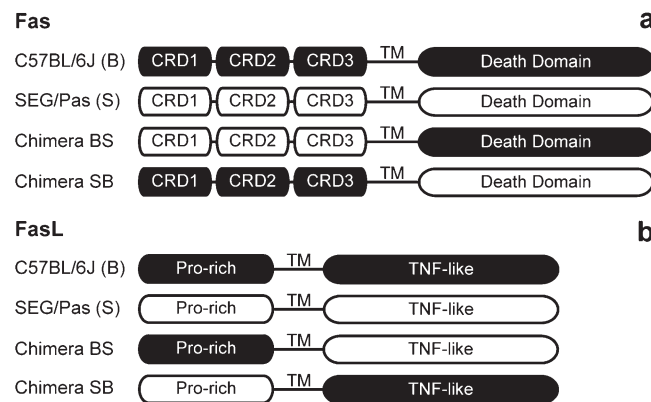


Fig. 1. Schematic representation of the chimerical constructs. **(a)** Fas protein structure, with the extracellular region comprising the three Cysteine-rich domains [(CRDs) 1, 2 and 3], the transmembrane region (TM) and the intracellular region consisting of the Death Domain. **(b)** FasL protein structure, with the intracellular region featured by the Proline-rich domain (Pro-rich), the TM and the extracellular region with the tumour necrosis factor-like domain (TNF-like). Black boxes represent regions of C57BL/6J origin, whereas white boxes represent regions of SEG/Pas origin. Nomenclature for the chimerical constructs defines always the intracellular domain first and then the extracellular; B, C57BL/6J; S, SEG/Pas.

we have determined the expression levels of every construct used for these experiments (supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online). Our results demonstrate that the chimerical constructs do not exhibit reduced expression compared with the wild-type constructs.

Fadd exhibits sequence variants between C57BL/6J and SEG/Pas

The receptor Fas interacts with Fas ligand (FasL) through its extracellular domain, whereas its intracellular region recruits the protein Fadd by domain homology. Given the importance of the polymorphic amino acids located on the intracellular region of Fas, through which it interacts with Fadd, the ensuing question was to find out whether the Fadd protein exhibits polymorphisms as well.

In order to tackle this problem, we analysed the *Fadd* coding sequence derived from the two strains. Interestingly, we identified five changes of nucleotide between SEG/Pas (Genbank accession no. EU917072) and C57BL/6J (Genbank accession no. NM_010175) (Figure 3a). We have compared the variations described in Ensemble database (<http://www.ensembl.org/index.html>) with these polymorphisms between C57BL/6J and SEG/Pas. Only one of them corresponds to the SEG/Pas versus C57BL/6J polymorphisms found in our study: T486C (Ensemble ID rs13472364). From those described in Ensemble, this is the only genetic variation affecting the coding sequence of *Fadd* since the rest of them are on either the 3' untranslated regions or intronic regions. However, it is 'synonymous', so it causes no change of amino acid. In our case, three of the five nucleotide variations found between C57BL/6J and SEG/Pas result in a change of amino acid: A152G (E51G), C177T (H59R) and A565G (N189D) (Figure 3b).

Remarkably, two of the amino acid changes are situated at the death effector domain (DED), by which Fadd recruits Procaspase-8. The other amino acid change is located at the C-terminus near the death domain (DD) (Figure 3b).

The ability of Fas to recruit Fadd varies with the mouse strain

To assess the functionality of the two different *Fadd* variants, together with those polymorphisms located at the sequence coding the intracellular region of *Fas*, we have measured the ability of Fas and Fadd proteins to interact using co-immunoprecipitation assay. Combining Fas and Fadd proteins from either C57BL/6J or SEG/Pas in double transfected Fas/Fadd-HEK-293 cells, our results indicate that the interaction between them is stronger in the Fas system of SEG/Pas mice than in C57BL/6J ('Basal' assay in Figure 4a). Interestingly, when we combine Fas and Fadd in heterologous combinations, their interaction is stronger when Fas derives from SEG/Pas.

The same results were obtained after induction with the Fas ligand, through the co-culture of the double transfected Fas/Fadd-HEK-293 cells with FasL-transfected HEK-293 cells (FasL-induced assay in Figure 4b).

Results of co-immunoprecipitation have been complemented with studies of apoptosis by TUNEL assay in HEK 293 cells co-transfected with *Fas* and *Fadd* cDNAs in the same combinations as in Figure 4 (Figure 5). Our results show a significant correlation with the data obtained from the co-immunoprecipitation experiments. Those two combinations exhibiting the highest levels of interaction between Fas and Fadd (SEG/Pas-derived Fas + SEG/Pas-derived Fadd, second lane and SEG/Pas-derived Fas + C57BL/6J-derived Fadd, fourth lane) show as well the highest rates of apoptosis.

Discussion

Inactivating mutations at *Fas* and/or *FasL* have been involved in several forms of cancer (5,10,19–21). In particular, we have reported the importance of the Fas system in controlling T-cell lymphoblastic lymphoma induced by γ -irradiation (12). We demonstrated that γ -irradiation is able to initially induce the expression of *Fas* and *FasL* as a defensive strategy of the cells and that T-cell lymphoblastic lymphomas exhibit a clear reduction on the expression levels of both proteins. Thus, progression of these lymphomas appears to be favoured by the inactivation of the Fas-mediated extrinsic pathway. In addition, we reported germ line functional polymorphisms at *Fas* and *FasL* genes in two mouse strains exhibiting extreme differences in genetic susceptibility to γ radiation-induced T-cell lymphoblastic lymphoma. Nucleotide variations in the coding sequence of these genes result in amino acid changes in critical domains of their intracellular and extracellular regions. In the case of *Fas*, the amino acid changes were located at the tumour necrosis factor receptor-like extracellular cysteine-rich domain (CRD) 1, as well as in CRD2, CRD3, and its intracellular death domain. In the case of *FasL*, we detected two amino acid changes in its intracellular region and four amino acid changes in its extracellular region (12,13). Since the interaction between Fas and FasL clearly depends on the intracellular and extracellular regions of both genes (22–29), we wanted to assess the relative contribution of polymorphisms at each of these four regions to the functionality of the Fas system. To this end, chimerical Fas and FasL proteins combining intracellular and extracellular polymorphic regions from C57BL/6J and SEG/Pas were constructed and the levels of induced apoptosis were investigated in co-cultures of transfected HEK-293 cells using TUNEL assays and measuring caspase-8 and caspase-3 activation. Our data revealed a complex scene with multiple interactions showing striking differences in the biological activity of

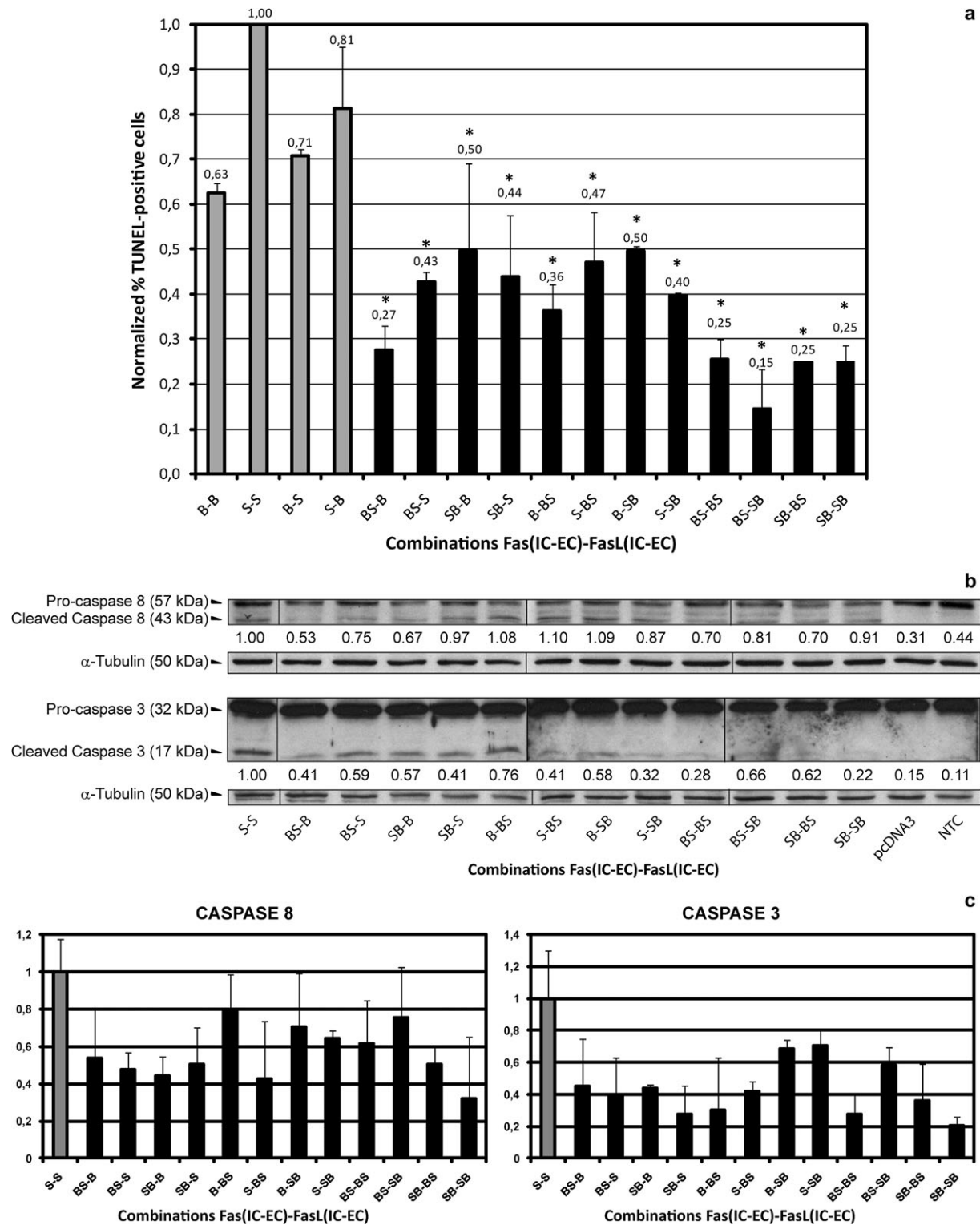


Fig. 2. Apoptosis induced by chimeral Fas–FasL systems. **(a)** Quantification of TUNEL-positive HEK-293 cells in co-cultures of cells transfected with chimeral and non-chimeral *Fas* and *FasL* cDNAs. Twenty-four hours after transfection, 1.5×10^6 HEK-293 cells transfected with *Fas* constructs were co-cultured in P100 culture plates with a similar number of cells transfected with *FasL* constructs, in the 16 possible combinations. Receptor–ligand combinations were allowed to interact for 8 h. The number of TUNEL-positive cells was counted from fields of at least 100 cells, estimated through optical microscopy, the percentage of positive cells was calculated as referred to the total number of cells, and the value for cells transfected with the empty vector was subtracted. The results are referred to the S–S combination. The combinations of transfected cells in co-cultures are indicated as Fas–FasL. For example, S–B denotes cells expressing *Fas* from SEG/Pas strain and cells expressing *FasL* from C57BL/6J. In the case of chimerical proteins, the first letter always corresponds to the strain origin of the intracellular region and then the extracellular. For example, SB–BS denotes a double chimeric combination where *Fas* is composed of the intracellular region from SEG/Pas and the extracellular region from C57BL/6J, whereas *FasL* is composed of the intracellular region from C57BL/6J and the extracellular one from SEG/Pas. *Denotes statistical significance compared with the S–S combination, with $P \leq 0.001$. **(b)** Representative western blots for caspase-8 and caspase-3 activation (cleaved). Protein extracts were obtained from co-cultures with the same combinations as those indicated in (a). The ratios (cleaved-caspase/procaspase) are referred to the S–S combination and indicated under the corresponding lanes. **(c)** Histograms show mean values of the ratios (cleaved-caspase/procaspase)—with their corresponding standard deviations—calculated from the quantification of various experiments of western blot performed for both caspase-8 and -3.

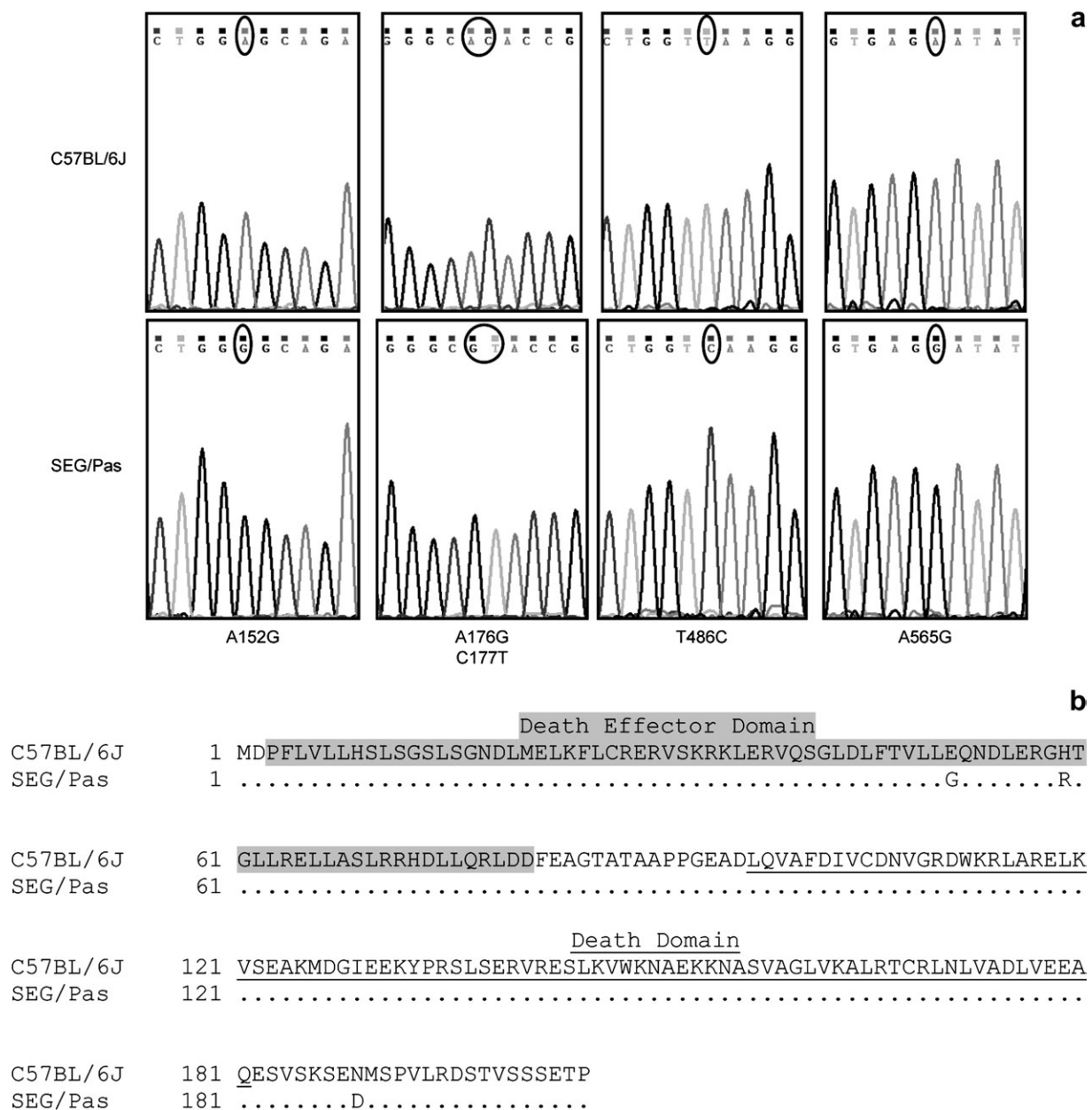


Fig. 3. *Fadd* cDNA variations and amino acid sequences comparison. **(a)** C57BL/6J- and SEG/Pas-derived *Fadd* cDNAs were sequenced and compared. Nucleotide changes (A152G, A176G, C177T, T486C and A565G) between C57BL/6J and SEG/Pas mice. Numbers on the left indicate the amino acid position from the initiation codon. Dots indicate sequence identity. Polymorphisms are indicated by the corresponding amino acid substitution. *Fadd* DED is shaded, and DD is underlined. Three nucleotide substitutions (A152G, A176G and C177T) involve two amino acid changes at the DED (E51G and H59R). An additional nucleotide change (A565G) affects the amino acid sequence near the C-terminus (N189D).

the Fas system. We confirm that the Fas system from SEG/Pas (strain resistant to γ radiation-induced T-cell lymphoma) is the most efficient one in terms of inducing the death signal (S–S combination) and demonstrate that any Fas–FasL interaction involving chimerical proteins drive cell apoptosis to a significant lower extent than the non-chimerical SEG/Pas and C57BL/6J Fas–FasL systems (Figure 2). It seems reasonable to think that the polymorphisms at both the intracellular and extracellular regions of Fas and FasL are involved in the differential ability of the system to drive cell apoptosis, as these variations might be affecting the folding of the proteins and thus their interaction and functionality. Alternatively, the chimerical constructs might as well produce proteins with reduced expression or stability, but this possibility has been ruled out by analysis of their expression

levels (supplementary Figure 1 is available at *Carcinogenesis* Online), which confirms that the chimerical constructs do not show impaired expression compared with their wild-type counterparts, and suggests that the diminished apoptosis found when the system consists of at least one chimerical element is not an artefact derived from this problem, but a result of the different functionality of the elements of the system depending on their haplotype.

As mentioned previously, in addition to Fas and FasL, another element exists in the Fas signalling pathway, *Fadd*, which is essential for the functionality of the Fas/FasL system (23). This gene has been described as a tumour suppressor since mice lacking it are prone to develop T-cell lymphoblastic lymphoma (15). Furthermore, spontaneous thymic lymphoma has been induced using dominant-negative

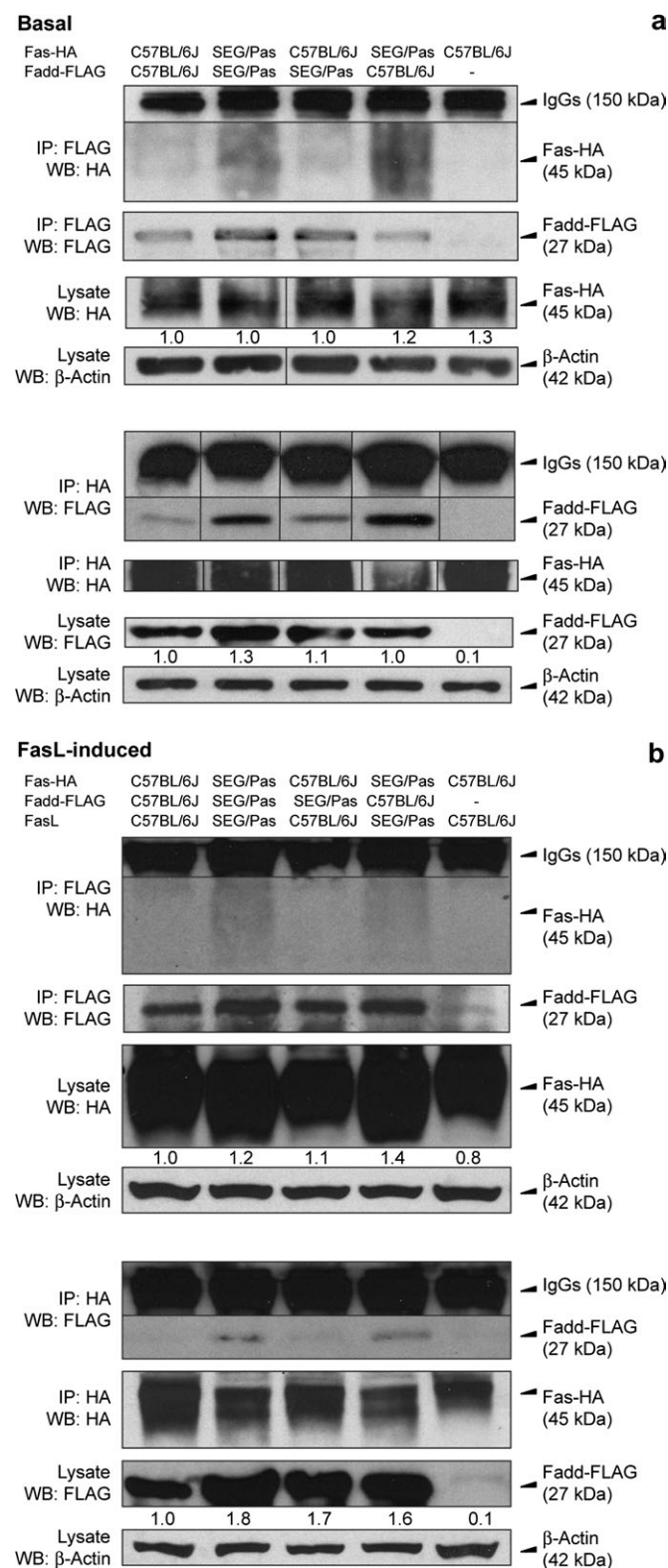


Fig. 4. Fas–Fadd co-immunoprecipitation. Interaction between Fas and Fadd depends on the strain of origin. (a) HEK-293 cells were co-transfected with C57BL/6J- or SEG/Pas-derived Fas-HA and Fadd-FLAG, as indicated. Total lysates were immunoprecipitated using specific anti-FLAG and anti-HA antibodies and then Fas-HA and Fadd-FLAG were detected by western blot using anti-HA and anti-FLAG antibodies, respectively. IgGs band (>150 kDa) appear due to lack of β-mercaptoethanol in loading buffer. As a control for transfection, the recombinant proteins Fas-HA and Fadd-FLAG were analysed in total lysates by western blot; β-actin was analysed as

mutants for this protein (30). The Fadd protein consists of a DD by which it electrostatically interacts with Fas-DD and a DED that hydrophobically recruits Procaspase-8 (23). In humans, it has been additionally demonstrated that both domains need to be covalently attached for proper interaction with FAS (30). It thus seems that Fadd self-association by the DED, through the so-called hydrophobic patch (surface in the vicinity of F25) and/or the RXDLΦ motif (residues 72–76), stabilizes Fadd for its binding to active Fas and so is required for DISC formation (30–33). In our case, the sequence of Fadd in SEG/Pas mice differs from that of C57BL/6J mice in three changes of amino acid, none of them located at the DD. Notably, the E51G polymorphism we find in *Fadd* cDNA involves an amino acid, proposed to allow the structural superposition between DED and DD, that forms part of the Procaspase-8 binding surface (30). However, our results from the co-immunoprecipitation assays suggest that it is the origin of Fas and not Fadd, what mainly determines their level of interaction. As well, these results correlate with the ability of each variant to induce apoptosis, as demonstrated in Figure 5, where it is showed that the presence of SEG/Pas-derived Fas is able to induce the highest level of apoptosis. On the other hand, the polymorphism at N189 might affect the phosphorylation status of Fadd at S191, which has been proposed as a key factor for the functionality of Fadd (34–37). This should be subject of further studies in the future.

Altogether, these results are in agreement with our previous results (13) and reinforce the idea that SEG/Pas mouse strain carries a more effective Fas-dependent apoptosis pathway than the C57BL/6J strain, sustaining our hypothesis for a model in which the Fas system may play a role in modulating the genetic susceptibility of mouse strains to develop T-cell lymphoblastic lymphomas.

In conclusion, four important points emerge from these analyses. The first one highlights the idea that the inactivation of the Fas-dependent extrinsic pathway of apoptosis plays an essential role in the progression of T-cell lymphoblastic lymphoma. The second one indicates that there exist specific polymorphisms at *Fas*, *FasL* and *Fadd* genes that differentiate mouse strains exhibiting

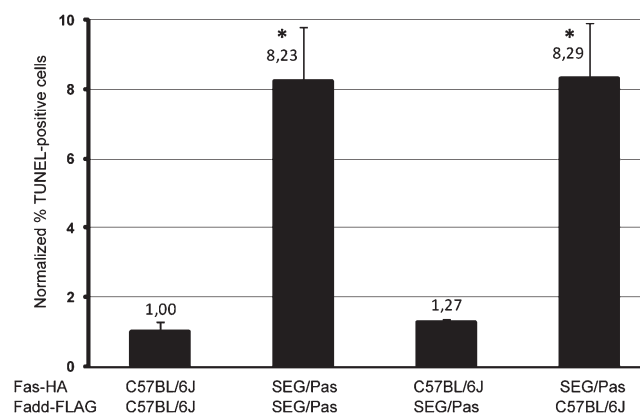


Fig. 5. Apoptosis is related to haplotype-determined Fas–Fadd interaction. Apoptosis analyses by TUNEL assay in HEK-293 cells co-transfected with C57BL/6J- or SEG/Pas-derived Fas-HA and Fadd-FLAG. The number of TUNEL-positive cells was counted from fields of at least 100 cells, estimated through optical microscopy, the percentage of positive cells was calculated as referred to the total number of cells and the value for cells transfected with the empty vector was subtracted. The results are referred to the C57BL/6J-C57BL/6J combination. *Denotes statistical significance compared with this combination, with $P < 0.001$.

a loading control. The ratios (Fas-HA or Fadd-FLAG/β-actin) in the whole lysates are referred to the C57BL/6J-C57BL/6J combination and indicated under the corresponding lanes. (b) The same experiment was done after induction of the system through a co-culture of Fas + Fadd-co-transfected cells with FasL-transfected cells.

extreme differences in susceptibility to γ radiation-induced T-cell lymphomas. These polymorphisms seem capable of modifying the biological activity of the Fas-apoptosis-signalling pathway. Thirdly, the study shows that the global functionality of the Fas-apoptosis-signalling pathway is dependent on the combined action of the functional polymorphisms at these three genes. Finally, a fourth point emerging from our research is that any conclusions based exclusively on the analysis of individual polymorphisms at only one of these genes is not enough to accurately predict the effectiveness of the Fas system or to estimate susceptibility to T-cell lymphomas. A complete analysis of at least the three genes appears to be a *sine qua non* condition for this.

Supplementary material

Supplementary Figure 1 can be found at <http://carcin.oxfordjournals.org/>

Funding

Spanish Ministry of Education and Science (contract number SAF2009-11426); Intramural Project by CIBERER (Instituto de Salud Carlos III) (INTRA/09/U749.2).

Acknowledgements

We thank I.Ors and M.A.Cobos for aid with animals and experiments, Drs J.L.Guenet and X.Montagutelli for providing SEG/Pas mice and Prof. A.Morales for critical reading of the manuscript.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Baumann,S. *et al.* (2002) Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr. Mol. Med.*, **2**, 257–272.
- Castro,J.E. *et al.* (1996) Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity*, **5**, 617–627.
- Fleck,M. *et al.* (1998) Fas/Fas ligand signaling during gestational T cell development. *J. Immunol.*, **160**, 3766–3775.
- Kishimoto,H. *et al.* (1998) A role for Fas in negative selection of thymocytes *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **187**, 1427–1438.
- Krammer,P.H. (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, **407**, 789–795.
- Kurasawa,K. *et al.* (1999) Fas modulates both positive and negative selection of thymocytes. *Cell. Immunol.*, **194**, 127–135.
- Moulian,N. *et al.* (1998) Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin. Immunol.*, **10**, 449–456.
- Schmitz,I. *et al.* (2003) An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J. Immunol.*, **171**, 2930–2936.
- Sprent,J. *et al.* (2002) The thymus and negative selection. *Immunol. Rev.*, **185**, 126–135.
- Nagata,S. (1996) Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality. *Genes Cells*, **1**, 873–879.
- Strasser,A. *et al.* (2009) The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*, **30**, 180–192.
- Villa-Morales,M. *et al.* (2006) Functional Fas (Cd95/Apo-1) promoter polymorphisms in inbred mouse strains exhibiting different susceptibility to gamma-radiation-induced thymic lymphoma. *Oncogene*, **25**, 2022–2029.
- Villa-Morales,M. *et al.* (2007) A role for the Fas/FasL system in modulating genetic susceptibility to T-cell lymphoblastic lymphomas. *Cancer Res.*, **67**, 5107–5116.
- Nagata,S. *et al.* (1995) The Fas death factor. *Science*, **267**, 1449–1456.
- Newton,K. *et al.* (2000) FADD/MORT1 regulates the pre-TCR checkpoint and can function as a tumour suppressor. *EMBO J.*, **19**, 931–941.
- Zhang,Y. *et al.* (2005) Conditional Fas-associated death domain protein (FADD): GFP knockout mice reveal FADD is dispensable in thymic development but essential in peripheral T cell homeostasis. *J. Immunol.*, **175**, 3033–3044.
- Fernandez-Piqueras,J. *et al.* (2002) Tumor modifier genes. *Rev. Oncol.*, **4**, 349–357.
- Perez-Gomez,E. *et al.* (2005) Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*, **24**, 4450–4461.
- Legembre,P. *et al.* (2004) Induction of apoptosis and activation of NF-kappaB by CD95 require different signalling thresholds. *EMBO Rep.*, **5**, 1084–1089.
- Muschen,M. *et al.* (2000) Defining CD95 as a tumor suppressor gene. *J. Mol. Med.*, **78**, 312–325.
- Medema,J.P. *et al.* (1997) FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.*, **16**, 2794–2804.
- Golstein,P. (2000) Signal transduction. FasL binds preassembled Fas. *Science*, **288**, 2328–2329.
- Jeong,E.J. *et al.* (1999) The solution structure of FADD death domain. Structural basis of death domain interactions of Fas and FADD. *J. Biol. Chem.*, **274**, 16337–16342.
- Papoff,G. *et al.* (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 38241–38250.
- Schneider,P. *et al.* (1997) Characterization of Fas (Apo-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18827–18833.
- Siegel,R.M. *et al.* (2000) The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat. Immunol.*, **1**, 469–474.
- Starling,G.C. *et al.* (1998) Analysis of the ligand binding site in Fas (CD95) by site-directed mutagenesis and comparison with TNFR and CD40. *Biochemistry*, **37**, 3723–3726.
- Kayagaki,N. *et al.* (1997) Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 3914–3919.
- Lettau,M. *et al.* (2008) Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 1684–1696.
- Carrington,P.E. *et al.* (2006) The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol. Cell*, **22**, 599–610.
- Muppidi,J.R. *et al.* (2006) Homotypic FADD interactions through a conserved RXDLL motif are required for death receptor-induced apoptosis. *Cell Death Differ.*, **13**, 1641–1650.
- Sandu,C. *et al.* (2006) FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell Death Differ.*, **13**, 2052–2061.
- Valmiki,M.G. *et al.* (2009) Death effector domain-containing proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 814–830.
- Gomez-Angelats,M. *et al.* (2003) Molecular evidence for the nuclear localization of FADD. *Cell Death Differ.*, **10**, 791–797.
- Hua,Z.C. *et al.* (2003) A function of Fas-associated death domain protein in cell cycle progression localized to a single amino acid at its C-terminal region. *Immunity*, **18**, 513–521.
- Imtiyaz,H.Z. *et al.* (2009) The death domain of FADD is essential for embryogenesis, lymphocyte development, and proliferation. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9917–9926.
- Park,S.M. *et al.* (2005) Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 610–616.

Received March 24, 2010; revised September 21, 2010; accepted September 28, 2010

Aurora Kinase B Activity Is Modulated by Thyroid Hormone during Transcriptional Activation of Pituitary Genes

Manuel Tardáguila,* Elena González-Gugel,* and Aurora Sánchez-Pacheco

Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain

Covalent histone modifications clearly play an essential role in ligand-dependent transcriptional regulation by nuclear receptors. One of the predominant mechanisms used by nuclear receptors to activate or repress target-gene transcription is the recruitment of coregulatory factors capable of covalently modify the amino terminal ends of histones. Here we show that the thyroid hormone (T3) produces a rapid increase in histone H3Ser10 phosphorylation (H3Ser10ph) concomitant to the rapid displacement of the heterochromatin protein 1 β (HP1 β) to the nuclear periphery. Moreover, we found that T3-mediated pituitary gene transcription is associated with an increase in H3Ser10ph. Interestingly, the Aurora kinase B inhibitor ZM443979 abolishes the effect of T3 on H3Ser10ph, blocks HP1 β delocalization, and significantly reduces ligand-dependent transactivation. Similar effects were shown when Aurora kinase B expression was abrogated in small interfering RNA assays. In an effort to understand the underlying mechanism by which T3 increases H3Ser10ph, we demonstrate that liganded thyroid hormone receptor directly interacts with Aurora kinase B, increasing its kinase activity. Moreover, using chromatin immunoprecipitation assays, we have shown that Aurora kinase B participates of a mechanism that displaces HP1 β from promoter region, thus preparing the chromatin for the transcriptional activation of T3 regulated genes. Our findings reveal a novel role for Aurora kinase B during transcriptional initiation in G0/G1, apart from its well-known mitotic activity. (*Molecular Endocrinology* 25: 385–393, 2011)

NURSA Molecule Pages: Nuclear Receptors: TR- α ; **Ligands:** Thyroid hormone.

In eukaryotic cells, genes are complexed with core histones and other chromosomal proteins to form either active euchromatin or silent heterochromatin (1–3). The tails of core histones are subjected to covalent posttranslational modifications which allow the recruitment of proteins such as heterochromatin protein (HP1) that modulate chromatin structure (4). In mammalian cells, HP1 β is present both in pericentric heterochromatin and in euchromatin where it represses gene expression (5), while HP1 α and HP1 γ are mainly associated with either constitutive heterochromatin or euchromatin, respectively. In histones H3 and H4, both lysine acetylation and serine phosphorylation are associated with transcrip-

tional activation, while lysine methylation at specific residues is linked to either transcriptional repression or activation. Lysine residues in histone tails can be mono-, di- or trimethylated by the action of histone methyltransferases. Methylation of the lysine 9 residue in H3 (H3K9me), particularly in the di- and trimethylated state, serves as a scaffold for HP1 proteins binding to the chromatin. It has been demonstrated that HP1 β bound to methylated H3K9 is released from chromatin by H3Ser10 phosphorylation. This “methyl-phos switch” mechanism occurs at the onset of mitosis and is regulated by Aurora kinase-B (6, 7). The role of Aurora kinase B during mitosis is well established as chromosome passenger protein kinase that regulates centrosome

ISSN Print 0888-8809 ISSN Online 1944-9917

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/me.2010-0446 Received October 28, 2010. Accepted December 9, 2010.

First Published Online January 14, 2011

* M.T. and E.G.-G. contributed equally to this study.

Abbreviations: ChIP, Chromatin immunoprecipitation; IP, immunoprecipitation; MSK1, mitogen- and stress-associated protein kinase 1; PRL, prolactin; RSK, ribosomal S6 kinases; siRNA, small interfering RNA; T3, thyroid hormone; TR, thyroid nuclear receptor; TRE, thyroid hormone response element.